



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**INTERAKCE TRIMETHYLCHITOSANU S TENZIDEM
NIAPROOF**

INTERACTION OF TRIMETHYLCHITOSAN WITH NIAPROOF SURFACTANT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Hana Zbořilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1417/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Hana Zbořilová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Interakce trimethylchitosanu s tenzidem Niaproof

Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše zaměřená na syntézu trimethylchitosanu a na vlastnosti a aplikace anionaktivního tenzidu Niaproof.
- 2) Na základě literární rešerše navrhnout syntézu TMC a způsob studia agregátů TMC a Niaproof.
- 3) Provést metylaci chitosanu a studovat agregační chování tenzidu Niaproof v přítomnosti TMC.
- 4) Zhodnotit přípravu TMC a průběh agregace Niaproof ve vztahu k potenciálním farmaceutickým aplikacím.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Hana Zbořilová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem interakce polykationtu N,N,N-trimethylchitosanu (TMC) s aniontovou povrchově aktivní látkou Niaproof® 4 ve vodě a fyziologickém roztoku. Z důvodu komerční nedostupnosti N,N,N-trimethylchitosanu byl tento polymer nejprve syntetizován z chitosanu, následovala jeho charakterizace pomocí nukleární magnetické rezonance a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Před samotným studiem systému polykation–anionaktivní tenzid bylo prozkoumáno chování aniontové povrchově aktivní látky Niaproof® 4 ve vodném a fyziologickém prostředí. Micelizace tenzidu Niaproof® 4 i agregace systému TMC–Niaproof® 4 bylo pozorováno pomocí fluorescenční spektroskopie s fluorescenční sondou pyren. Na základě měření byly získány hodnoty kritické micelární a kritické agregační koncentrace. Bylo potvrzeno, že přítomnost chloridu sodného podporuje micelizaci tím, že zvyšuje iontovou sílu roztoku, dochází tedy k poklesu CMC ve fyziologickém prostředí. Interakce TMC–Niaproof® 4 probíhá při nižší koncentraci než CMC jak ve vodném, tak fyziologickém prostředí. Při vyšších koncentracích tenzidu dochází k fázové separaci, která vede ke stabilizaci systému.

ABSTRACT

This thesis is focused on the study of interaction of the polycation N,N,N-trimethylchitosan (TMC) with the anionic surfactant Niaproof® 4 in water and physiological saline solution. Due to the commercial unavailability of N,N,N-trimethylchitosan, the polymer was first synthesized from chitosan, followed by NMR and FTIR characterization. Before the study of the system polycation–anionic surfactant itself, the behavior of the anionic surfactant Niaproof® 4 in aqueous solution and physiological saline solution was explored. The micellization of the surfactant Niaproof® 4 and the aggregation of TMC–Niaproof® 4 system were observed by fluorescence spectroscopy using the fluorescence probe pyrene. Values of critical micelle and critical aggregation concentration were determined on the basis of measurements. It was confirmed that presence of the sodium chloride supports the micellization by increasing the ionic strength of the solution, which leads to decrease of CMC in physiological saline solution. The interaction of TMC–Niaproof® 4 occurs at lower concentration than CMC in both aqueous and physiological environments. Phase separation occurs at higher concentrations of the surfactant leading to stabilization of the system.

KLÍČOVÁ SLOVA

chitosan, N,N,N-trimethylchitosan (TMC), Niaproof®, pyren, kritická micelární koncentrace (CMC), kritická agregační koncentrace (CAC), fluorescenční spektroskopie

KEYWORDS

chitosan, N,N,N-trimethylchitosan (TMC), Niaproof®, pyrene, critical micelle concentration (CMC), critical aggregation concentration (CAC), fluorescence spectroscopy

ZBOŘILOVÁ, Hana. *Interakce trimethylchitosanu s tenzidem Niaproof*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113588>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborný dohled a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D., Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D., Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D., Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. a Mgr. Janu Richtárovi za pomoc s charakterizací N,N,N-trimethylchitosanu. Děkuji také Dominiku Veselému za ochotu a užitečné rady týkající se syntézy N,N,N-trimethylchitosanu. Ráda bych také srdečně poděkovala Bc. Janě Szabové za věnovaný čas, trpělivost, vstřícnost, odborné a přínosné rady, které byly velmi důležité pro vypracování bakalářské práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, partnerovi a přátelům za podporu během studia a psaní bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Polyelektrolyty.....	8
2.2	Chitosan	8
2.2.1	Struktura	9
2.2.2	Vlastnosti a využití	10
2.2.3	Rozpustnost	10
2.3	N,N,N-trimethylchitosan	10
2.3.1	Stupeň kvarternizace a rozpustnost	11
2.3.2	O–methylace.....	11
2.3.3	Cytotoxicita	11
2.3.4	Vlastnosti a využití	12
2.3.5	Syntéza	13
	2.3.5.1 Historie.....	13
	2.3.5.2 Stanovení stupně kvarternizace a procenta O–methylace...	13
	2.3.5.3 NMR spektrum.....	14
	2.3.5.4 FTIR spektrum	15
2.4	Povrchově aktivní látky	15
2.4.1	Kritická micelární koncentrace a její možné stanovení.....	16
	2.4.1.1 Stanovení CMC fluorescenční spektroskopii.....	17
2.4.2	Tetradecylsulfát sodný (STS), Niaproof®	17
	2.4.2.1 Vliv molekulové struktury STS a Niaproof® 4 na CMC.....	18
	2.4.2.2 Toxicita Niaproof® 4	18
	2.4.2.3 Vlastnosti a využití Niaproof® 4	19
2.5	Interakce polykation–povrchově aktivní látka.....	19
2.5.1	Kritická agregační koncentrace	20
2.6	Fluorescence	20
2.6.1	Fluorescenční zákony	21
2.6.2	Fluorescenční sondy	22
	2.6.2.1 Pyren	22
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	24

3.1	Studium interakcí chitosanu se záporně nabitými tenzidy	24
3.2	Studium interakcí N,N,N-trimethylchitosanu a jejich následné využití v nosičových systémech	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Chemikálie	26
4.2	Syntéza N,N,N-trimethylchitosanu	27
4.3	Příprava vzorků	29
4.3.1	Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy	29
4.3.2	Příprava vzorků pro měření CMC	29
4.3.2.1	<i>Stanovení CMC s fluorescenční sondou pyren</i>	29
4.3.3	Příprava vzorků pro měření CAC	30
4.3.3.1	<i>Stanovení CAC s fluorescenční sondou pyren</i>	30
4.4	Metody a standardní vyhodnocení	30
4.4.1	Fluorescenční spektroskopie	30
4.4.2	Emisní a excitační polaritní index	31
4.4.3	Excimer a monomer	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1	Charakterizace TMC produktů	34
5.2	Chování Niaproof® 4 ve vodných roztocích	36
5.3	Interakce TMC–Niaproof® 4	37
6	ZÁVĚR	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	48
8.1	Seznam zkratk	48
8.2	Seznam symbolů	49
9	PŘÍLOHY	50
9.1	Stanovení CMC ve vodě	50
9.2	Stanovení CMC v 0,15 M NaCl	51
9.3	Stanovení CAC ve vodě	52
9.4	Stanovení CAC v 0,15 M NaCl	53

1 ÚVOD

Problematika interakce polymeru s opačně nabitou povrchově aktivní látkou je stále aktuálním tématem, kterým se zabývají vědečtí pracovníci napříč celým světem. Výzkum v této oblasti probíhá i na naší fakultě. Interakci polykationtů a aniontových tenzidů studovala Ing. Barbora Tesařová ve své diplomové práci i Ing. et Ing. Sabína Jarábková také v diplomové práci, na jejíž poznatky poté navázala svou bakalářskou prací Bc. Jana Szabová.

Interakcí systému polymer–opačně nabitý tenzid lze v závislosti na koncentraci tenzidu připravit fázově separovaný hydrogel nebo nosičový systém pro cílenou distribuci léčiv s řízeným uvolňováním. Na základě cíleného využití je však nutno vybrat vhodnou dvojici polyelektrolyt–tenzid o správné koncentraci a zajistit patřičné podmínky (iontová síla, teplota, ...) pro interakci.

Ve své bakalářské práci se věnuji interakci polykationtu N,N,N-trimethylchitosanu s anionaktivní povrchově aktivní látkou Niaproof® 4. Pro potenciální farmaceutické využití byly obě látky vybrány pro své unikátní vlastnosti. TMC je biokompatibilní, biodegradabilní, netoxický polykation, který oproti nemodifikovanému chitosanu disponuje zvýšenou rozpustností, která výrazně limitovala chitosan v aplikacích uskutečňujících se v prostředích o pH vyšším než 6. Součástí práce je také syntéza TMC, která byla nezbytná z důvodu jeho komerční nedostupnosti. Aniontový tenzid Niaproof® 4, větvená forma tetradecylsulfátu sodného, se pro svou biokompatibilitu a schopnost destruovat žilní endotel již ve farmaceutickém průmyslu uplatňuje jako sklerotizační látka při sklerotizaci varixů. Je aktivní složkou mnoha léčiv, nachází se například v léčivech Sotradecol® nebo Fibro-Vein™.

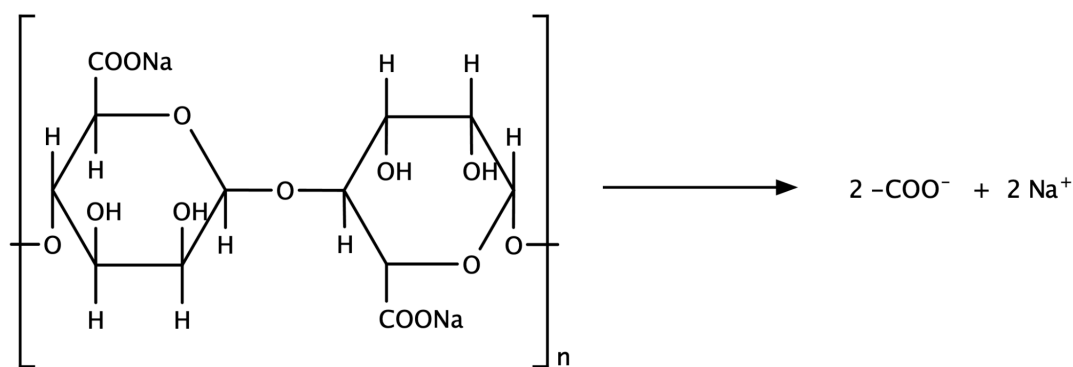
Předložená práce je zaměřená na studium chování syntetizovaného TMC v přítomnosti anionaktivního tenzidu Niaproof® 4. Pro pozorování interakce tohoto systému ve vodném a fyziologickém roztoku byla vybrána fluorescenční spektroskopie, při níž byl jako fluorescenční sonda využit pyren pro svou unikátní senzibilitu na polaritu prostředí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyelektrolyty

Termín polyelektrolyt je používán pro vysokomolekulární látku, která ve své struktuře obsahuje funkční skupiny schopné elektrolytické disociace v závislosti na charakteru prostředí. Podle povahy funkčních skupin, které podléhají disociaci, se polyelektrolyty dělí následovně: polyelektrolyty obsahující kyselé skupiny ($-\text{COO}^-$), polyelektrolyty obsahující zásadité skupiny ($-\text{NH}_3^+$) a amfoterní polyelektrolyty obsahující jak kyselé, tak zásadité skupiny (proteiny) [1].

Prostřednictvím disociace vznikají makroionty a protiionty. Makroionty jsou typické velkým množstvím elementárních nábojů, protiionty se vyznačují příslušným počtem malých iontů opačného náboje. Protiionty se nachází v blízkosti polymerního řetězce díky elektrostatickým silám, které působí mezi makroionty a protiionty. Polyelektrolyty se silně kyselými skupinami disociují zcela úplně, zatímco ty se slabě kyselými a slabě zásaditými skupinami disociují pouze částečně [1, 2]. Na Obr. 1 je předveden vznik makroaniontu a protiiontu u alginátu sodného.

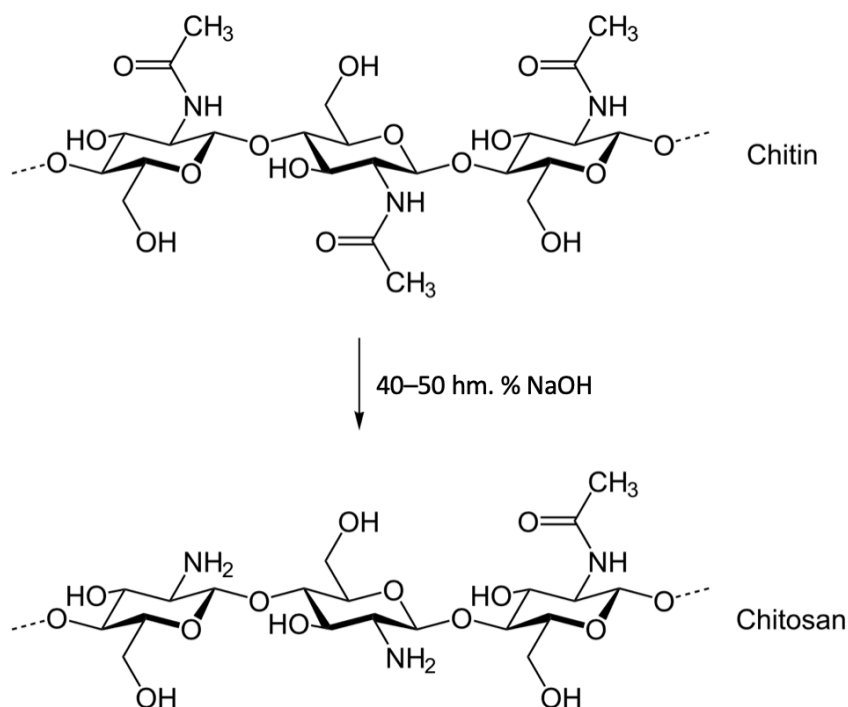


Obr. 1: Vznik makroaniontu a protiiontu u alginátu sodného

Vlastnosti polyelektrolytů v roztoku nebo na nabitěm povrchu ovlivňuje celá řada faktorů, což je jejich hlavní nevýhodou. Mezi tyto faktory patří koncentrace polyelektrolytu, frakce disociovaných iontových skupin, hustota náboje na řetězci, kvalita rozpouštědla pro polymerní kostru, dielektrická konstanta roztoku nebo přítomnost dalších látek zejména nízkomolekulárních solí a jejich koncentrace. Mezi typické polyelektrolyty patří například chondroitin sulfát, hyaluronan, DNA, alginát, pektin, chitosan či syntetické polymery (polystyrensulfonát sodný) [3].

2.2 Chitosan

Chitosan je aminoglukopyran složený z β -1,4 vázaným D-glukosaminem s N-acetyl-D-glukosaminovými rezidui náhodně rozloženými v polymerním řetězci. Jedná se o produkt derivovaný z bazické N-deacetylce chitinu [4]. K deacetylaci je využíván 40–50 hm. % vodný roztok NaOH za teploty vyšší než $100\text{ }^\circ\text{C}$ [3]. Reakce je zobrazena na Obr. 2.



Obr. 2: N-deacetylace chitinu [5]

Chitin má ve své struktuře v porovnání s chitosanem více N-acetylglukosaminových jednotek. Tento zásadní rozdíl mezi nimi lze kvantifikovat pomocí hodnoty F_A , která udává podíl glukosaminových jednotek vzhledem k celkovému počtu jednotek (glukosaminových a N-acetylglukosaminových) a je známá jako stupeň acetylce (DA z angl. *Degree of Acetylation*), případně stupeň deacetylce (DD z angl. *Degree of Deacetylation*). Stupeň deacetylce, který závisí na původu použitého chitinu a podmínkách reakce, je důležitým parametrem, jež určuje mnoho fyzikálně-chemických a biologických vlastností chitosanu, jako je krystalinita, hydrofilnost, degradace, rozpustnost nebo buněčná odezva. Je například známo, že stupeň deacetylce snižuje molekulovou hmotnost chitosanu. Čím vyšší je stupeň deacetylce, tím je vyšší čistota chitosanu, proto se pro biomedicínské aplikace používá chitosan se stupněm deacetylce v rozmezí 75–98 %. Z těchto důvodů je nezbytné zvolit optimální stupeň deacetylce na základě potřebného využití [4, 6, 7, 8].

V laboratorních podmínkách je chitosan ve formě bílého až světle béžového prášku v závislosti na jeho molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost oligomeru se pohybuje v rozmezí 1 000–10 000 Da, u nízkomolekulárního chitosanu 10 000–250 000 Da a u vysokomolekulárního je molekulová hmotnost větší než 250 000 Da [9].

2.2.1 Struktura

V molekule chitosanu se nachází tři reaktivní funkční skupiny: primární aminoskupina, primární a sekundární hydroxyskupina. Primární hydroxyskupina bývá často substituována spojovacími články, na které se váže aktivní složka – léčivo nebo skupina, která je zodpovědná za zacílení léčiva či zvýšení rozpustnosti ve vodě. Sekundární hydroxyskupina je modifikována především za účelem zvýšení rozpustnosti ve vodě. Primární aminoskupina snadno podléhá kvarternizaci, čímž lze docílit zvýšení rozpustnosti chitosanu ve vodě a tvorby komplexů s ionty kovů. Chitosan má povahu polykationtu právě díky této primární aminoskupině, která se vlivem působení kyselého prostředí nabije kladně [10].

2.2.2 Vlastnosti a využití

Chitosan s vlastnostmi jako jsou biokompatibilita, biodegradabilita, netoxicit a nízká alergenicit představuje velký potenciál v uplatnění pro celou škálu odvětví. Je využíván v biomedicínském a farmaceutickém průmyslu jako nosič léčiv s kontrolovaným uvolňováním nebo při výrobě scaffoldů, kde slouží jako matrice pro růst nových buněk, tkání, dokonce i orgánů [4, 10, 11].

Nedávný výzkum také odhalil antibakteriální účinky proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím a houbám při $\text{pH} < 6$. Mechanismus účinku není doposud přesně stanoven, avšak převládá předpoklad, že je založen na interakcích kladně nabitých aminoskupin se záporně nabitými komponenty mikrobiálních buněčných membrán [10].

Studium chitosanu dále vedlo k objevu protinádorové aktivity, kde pouze nízkomolekulární chitosan vykazuje schopnost indukovat tvorbu cytokinů (buněčných signálních molekul) i přes zvýšenou proliferaci T-lymfocytů [11].

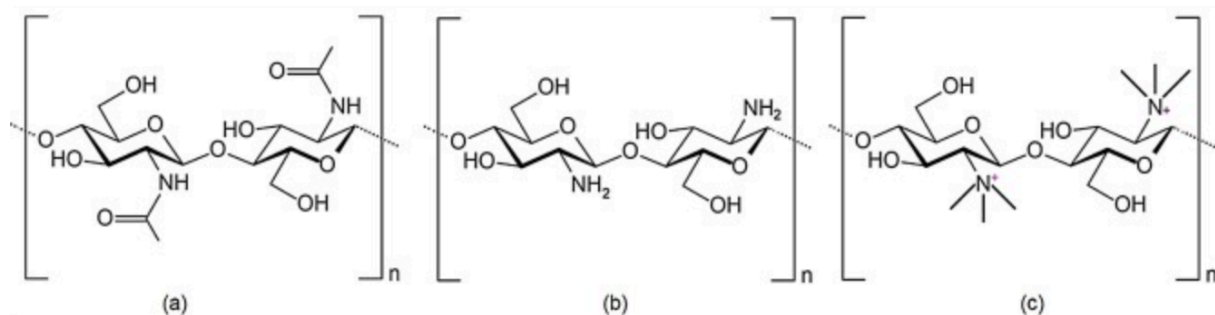
2.2.3 Rozpustnost

Chitosan nachází uplatnění v celé řadě dalších oborů, nicméně je jeho využití limitováno rozpustností. V krystalické formě je chitosan rozpustný ve vodných prostředích s pH nižším než 6, kdy volné protonované aminoskupiny na glukosaminu usnadňují molekule chitosanu se rozpustit ve zředěných organických (HCOOH , CH_3COOH) i anorganických (1% HCl , HNO_3) kyselinách. Nicméně při pH vyšším než 6 volné aminoskupiny na glukosaminu postrádají elektrostatické odpuzování, tudíž nemohou být protonovány a chitosan se v neutrálním a bazickém prostředí stává nerozpustným [4].

Nicméně v tělech živých organismů se vyskytují prostředí s pH vyšším než 6 (fyziologické pH člověka je 7,34). Z tohoto důvodu vzrostla potřeba modifikovaných derivátů, které budou v těchto prostředích rozpustné a zůstane zachována biokompatibilita, biodegradabilita a netoxicit.

2.3 N,N,N-trimethylchitosan

Trimethylchitosan je jeden z N-alkyl derivátů chitosanu, který vzniká nahrazením primární aminoskupiny na pozici C_2 za kvartérní aminoskupinu, jak je znázorněno na Obr. 3. Jedná se o derivát s vyšší solubilitou a bazicitou, dokonce i při nižších stupních kvarternizace, v porovnání s chitosanem a jeho solemi [12].



Obr. 3: Struktura: a) chitin; b) chitosan; c) N,N,N-trimethylchitosan [13]

2.3.1 Stupeň kvarternizace a rozpustnost

Stupeň kvarternizace (DQ z angl. *Degree of Quaternization*) je relativní počet kladných nábojů dostupných na molekule pro interakce [14]. Lze jej ovlivnit zvýšením počtu reakčních stupňů, prodloužením doby reakce nebo použitím chitosanu s různými stupni deacetylace [6].

Trimethylchitosan, se stupněm kvarternizace nižším než 10 %, je rozpustný v kyselém, neutrálním i zásaditém prostředí (pH v rozmezí 1–9 do koncentrace 10 hm. %). Nejvyšší rozpustnost u trimethylchitosanu je známa se střední hodnotou stupně kvarternizace (DQ = 40 %) nezávisle na rozdílné deacetylaci a molekulové hmotnosti.

Solubilita TMC je ovlivněna stupněm deacetylace, molekulovou hmotností původního chitosanu, stupněm kvarternizace a procentem O–methylace. Čím nižší je DD, tím je menší šance tvorby kvartérní amonné soli během methylace, což přímo vede k nižší rozpustnosti. Bylo zjištěno, že rozpustnost TMC s DQ = 60 %, získaného z chitosanu s DD = 40 %, byla stále velmi nízká. Nicméně TMC připravený z chitosanu DD = 95 % už při DQ = 25 % byl rozpustný přes celou stupnici pH [12].

Zvýšení solubility je přisuzováno náhradě primární aminoskupiny na pozici C₂ chitosanu kvartérní aminoskupinou a prevenci tvorby vodíkové vazby mezi aminovou a hydroxylovou skupinou chitosanového skeletu [6, 13].

2.3.2 O–methylace

Při vyšších stupních kvarternizace je přítomna O–methylace, která je doprovodnou reakcí při přípravě trimethylchitosanu. Je vysoce nežádoucí, protože ovlivňuje strukturu, biologické a fyzikálně-chemické vlastnosti získaného TMC. O–methylace na hydroxylových skupinách v pozicích C₃ a C₆ chitosanu obecně vede k méně rozpustným produktům, disparitě v délce polymerního řetězce, změnám schopnosti absorpce a možnosti štěpení řetězce [6, 15].

Je tedy nezbytné připravit polymery trimethylchitosanu s vysokým stupněm kvarternizace, ale s nízkým procentem O–methylace. Ve snaze tohoto docílit bylo prokázáno, že přítomnost O–methylace lze redukovat snížením počtu reakčních stupňů (nejlépe jednostupňovou methylací), které však mají za následek nižší stupeň kvarternizace [6, 16].

2.3.3 Cytotoxicita

Cytotoxicita TMC závisí na struktuře, nejvíce je ovlivněna procentem O–methylace, stupněm deacetylace a stupněm kvarternizace. Účinky struktury polymeru na buňky L929 byly zkoumány testováním viability buněk pomocí MTT testu. Byla vyhodnocena hodnota IC₅₀, která určuje koncentraci TMC vedoucí k 50% inhibici buněčného růstu. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 1.

TMC80-10 (TMC s 76,6% kvarternizací a 8,5% deacetylací) byl obzvláště toxický s hodnotou IC₅₀ = 10 µg/ml na rozdíl od polymerů TMC10-40 a TMC20-60, které byly zcela netoxické s výsledkem IC₅₀ > 1 mg/ml. Z toho vyplývá, že cytotoxicita trimethylchitosanu je ovlivněna proporcionálním poměrem DD : DQ. Cytotoxicita TMC začala klesat, když poměr DD : DQ byl vyšší než 1 a TMC nevykazoval toxicitu, když poměr DD : DQ byl přibližně 3 : 1. Dále je z tabulky patrné, že s rostoucí O–methylací narůstá hodnota IC₅₀, což potvrzuje nežádoucí účinky O–methylace na vlastnosti trimethylchitosanu [17].

Tab. 1: Cytotoxicita TMC polymerů studována na L929 fibroblastových buňkách pomocí MTT testu (inkubace 3 hodiny) [17]

polymer	DQ [%]	DD [%]	3O-CH ₃ [%]	6O-CH ₃ [%]	IC ₅₀ [μg/ml]
TMC10-40	13,9	39,1	2,4	7,0	> 1 000
TMC20-20	23,0	20,8	11,3	16,7	24
TMC20-60	23,4	65,2	3,9	9,0	> 1 000
TMC40-10	42,4	12,4	6,1	8,0	14
TMC40-40	39,0	39,3	4,9	9,3	12
TMC80-10	76,6	8,5	58,0	52,0	10

2.3.4 Vlastnosti a využití

Jak již bylo zmíněno výše, kvarternizace dusíku aminoskupiny zvýšila rozpustnost chitosanu ve vodném prostředí, chitosan si však zachoval povahu polykationtu i potřebné vlastnosti jako jsou biokompatibilita, biodegradabilita, netoxicitá a nízká alergenicitá. Obecně lze říci, že trimethylchitosan disponuje vylepšenými vlastnostmi i v rámci aplikací.

Ve snaze potvrdit hypotézu zvýšené účinnosti kladně nabitého derivátu chitosanu, Kotzé a spol. zkoumali efekt stupně kvarternizace v souvislosti s permeačním účinkem. Hustota náboje (DQ) určuje počet kladných nábojů, které jsou v molekule k dispozici pro interakce s negativně nabitými místy epitelové membrány, a tím ovlivňuje vlastnosti zvyšující absorpci léčiv. TMC zvyšuje transport hydrofilních molekul paracelulární cestou otevřením těsných spojení mezi epitelovými buňkami (angl. *Tight junctions*), což způsobuje pokles transepitelární elektrické rezistance (TEER z angl. *Transepithelial Electrical Resistance*). Tyto účinky byly potvrzeny studiem léčiv na bázi peptidů (buserelin, oktreotid) a [¹⁴C]-mannitolu, který se využívá ke značení paracelulárních cest.

Podobně jako chitosan má TMC také mukoadhezivní potenciál, na který má vliv stupeň kvarternizace. Studie, zabývající se tímto vlivem, jsou však protichůdné. Sandri a spol. uvedli, že se mukoadheze TMC na buňčinní sliznici zvyšuje s rostoucím stupněm kvarternizace. Nýbrž Snyman, Hamman a Kotzé zjistili, že mukoadheze TMC poklesla se zvýšeným DQ mezi 22,1 a 48,8 %. Tato skutečnost je připisována přítomnosti amoniových skupin ve struktuře TMC a jejich interakci s aniontovými částmi kyseliny sialové a sulfonové v mucinu [13].

I přes to, že mechanismus antibakteriálního účinku chitosanu není stále definitivně objasněn, platí předpoklad, že tento účinek je výsledkem iontové interakce mezi kladnými náboji ve struktuře TMC a záporně nabitým buněčným povrchem bakterií. Kvarternizací chitosanu se zvýšil pozitivní náboj na molekule TMC, z tohoto důvodu je antibakteriální aktivita trimethylchitosanu vyšší než u chitosanu. Navíc ve srovnání s HTCC (N-([2-hydroxy-2-trimethylammonium])propylchitosanchlorid), který je používán jako antibakteriální činidlo za alkalických podmínek, měl TMC vyšší antibakteriální účinek proti *Salmonella cholerae-suis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* z hlediska MIC (minimální inhibiční koncentrace) a MBC (minimální baktericidní koncentrace) [12].

V neposlední řadě lze trimethylchitosan využít k cílené distribuci léčiv s řízeným uvolňováním. Dosud byly použity nanočástice TMC v medicínských aplikacích pro léčbu hypertenze, revmatoidní artritidy, idiopatických střevních zánětů, mezi které patří Crohnova

choroba, a také byly tímto způsobem zacíleny různé formy rakoviny. Pro preklinické použití nanočástic TMC jako nosičového systému proběhlo podávání orálně a parenterálně [13].

2.3.5 Syntéza

2.3.5.1 Historie

Trimethylchitosan byl poprvé syntetizován H. Terayamou v polovině dvacátého století. Produktem této syntézy byl žlutohnědý prášek, který byl pojmenován jako Macramin.

Následovaly modifikované postupy syntézy, které využívaly různá reakční schémata. Autoři těchto postupů byli Muzzarelli a Tanfani (1985), Domard, Rinaudo, Terrassin (1986) a Dung, Milas, Rinaudo a Desbrieres (1994). Všichni se však ve svých návrzích potýkali buď s nízkou rozpustností ve vodě, nebo s rozsáhlou dimethylací.

První úspěšná syntéza ve vodě rozpustného TMC s vysokým stupněm kvarternizace a nízkou dimethylací byla uskutečněna Sievaem a spol. za použití dvoustupňové redukční methylace v roce 1998. Při tomto postupu byl chitosan rozpuštěn ve vodném roztoku hydroxidu sodného (NaOH) s jodidem sodným (NaI). Dále se k výše uvedené směsi přidal methyljodid (CH_3I) s N-methyl-2-pyrrolidonem (NMP), což vedlo k tvorbě TMC. V této publikaci je také nastíněna jednostupňová syntéza, při které byl chitosan dispergován v N-methyl-2-pyrrolidonu s methyljodidem a jodidem sodným. Směs byla poté zalkalizována přidavkem vodného roztoku hydroxidu sodného.

V roce 2007 Britto a Assis syntetizovali TMC reakcí chitosanu s dimethylsulfátem (DMS) za alkalických podmínek, bohužel ve výsledném produktu byla odhalena O-methylace. O rok později Verheul a kol. navrhli jednoduchý dvoustupňový mechanismus syntézy TMC reakcí chitosanu se směsí kyseliny mravenčí a formaldehydu za vzniku dimethylchitosanu (DMC). Přidavkem methyljodidu za alkalických podmínek N-methyl-2-pyrrolidonu a následným promýváním vodným roztokem chloridu sodného (NaCl) vznikl TMC bez O-methylace, s vysokým stupněm kvarternizace, rozpustností ve vodě a membránovou permeabilitou [13].

2.3.5.2 Stanovení stupně kvarternizace a procenta O-methylace

Mezi základní charakteristiky trimethylchitosanu patří stupeň kvarternizace a procento nežádoucí doprovodné O-methylace. Jak již bylo zmíněno výše (2.3.2), tyto charakteristiky jsou úzce spjaty s výslednou rozpustností a toxicitou TMC, proto je potřeba jejich stanovení.

Výpočet stupně kvarternizace TMC vyjadřuje rovnice:

$$\text{DQ} [\%] = \frac{[(\text{CH}_3)_3]}{9 \cdot [\text{H}]} \cdot 100, \quad (1)$$

kde DQ [%] značí stupeň kvarternizace v procentech, $[(\text{CH}_3)_3]$ je zintegrovaný peak příslušející kvartérní aminoskupině v 3,1–3,3 ppm, [H] představuje součet hodnot zintegrovaných peaků patřících protonu ^1H chitosanu, nacházejících se v rozmezí 4,7–5,7 ppm. Je to signál související s atomy vodíku vázanými na uhlík C_1 v molekule TMC a je využíván jako interní standard [15, 18].

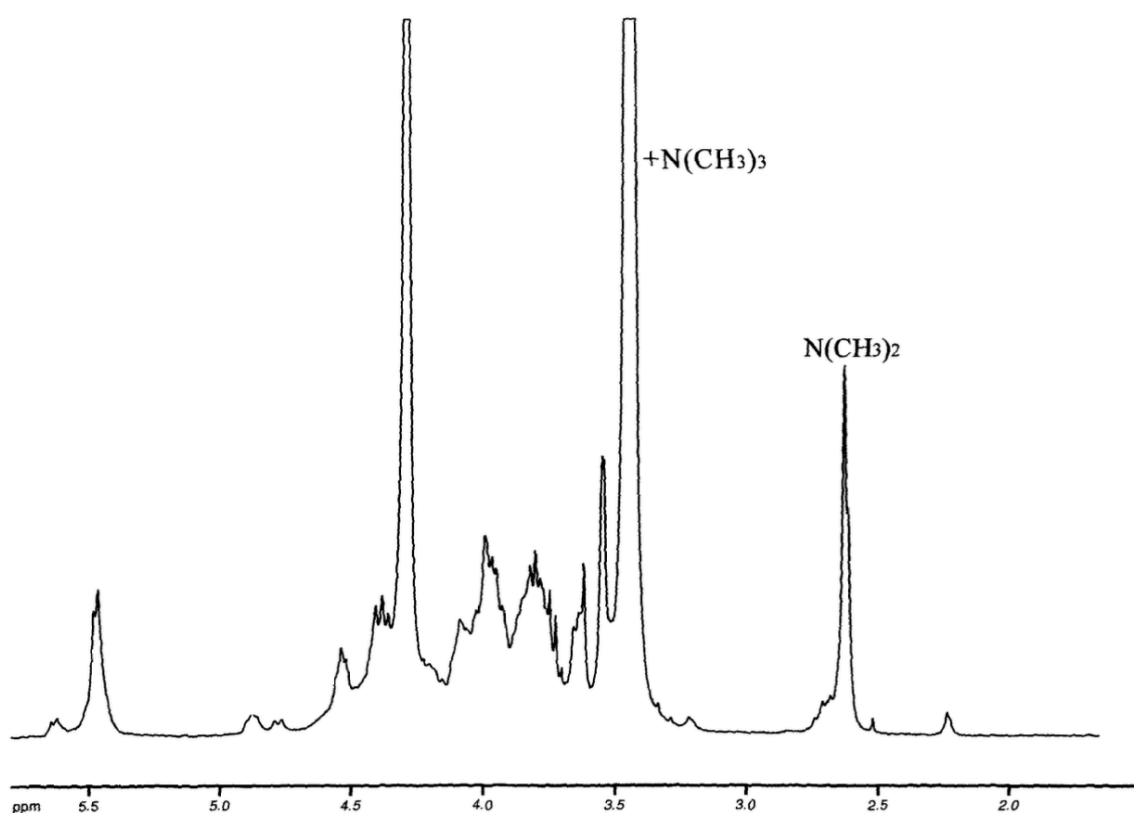
Rovnice pro výpočet procenta 3O-methylace a 6O-methylace je definována:

$$\text{DOM} [\%] = \frac{[(\text{CH}_3)_3]}{3 \cdot [\text{H}]} \cdot 100, \quad (2)$$

kde DOM [%] vyjadřuje procentuální zastoupení O-methylace, $[(CH_3)_3]$ reprezentuje zintegrované peaky příslušející methylovaným hydroxylovým skupinám v 3,4 ppm (DOM-6) nebo 3,5 ppm (DOM-3). [H], stejně jako tomu bylo u rovnice pro výpočet stupně kvarternizace TMC, představuje součet hodnot zintegrovaných peaků náležících protonu 1H chitosanu, nacházejících se v rozmezí 4,7–5,7 ppm. A opět se jedná o interní standard [15].

2.3.5.3 NMR spektrum

1H -NMR spektrum TMC získaného z dvoustupňové methylace z reference [19], která se stala podkladem pro optimalizovanou přípravu TMC, je uveden na Obr. 4. Peak nacházející se při hodnotě 2,6 ppm připadá intenzitě signálu dimethylované aminoskupiny. Vrchol pro 3,4 ppm se přisuzuje kvartérní aminoskupině. Peak v rozmezí 3,5–3,6 ppm značí přítomnost nežádoucí O-methylace a peaky připadající protonu 1H chitosanu se nacházejí v rozmezí 4,7–5,7 ppm.

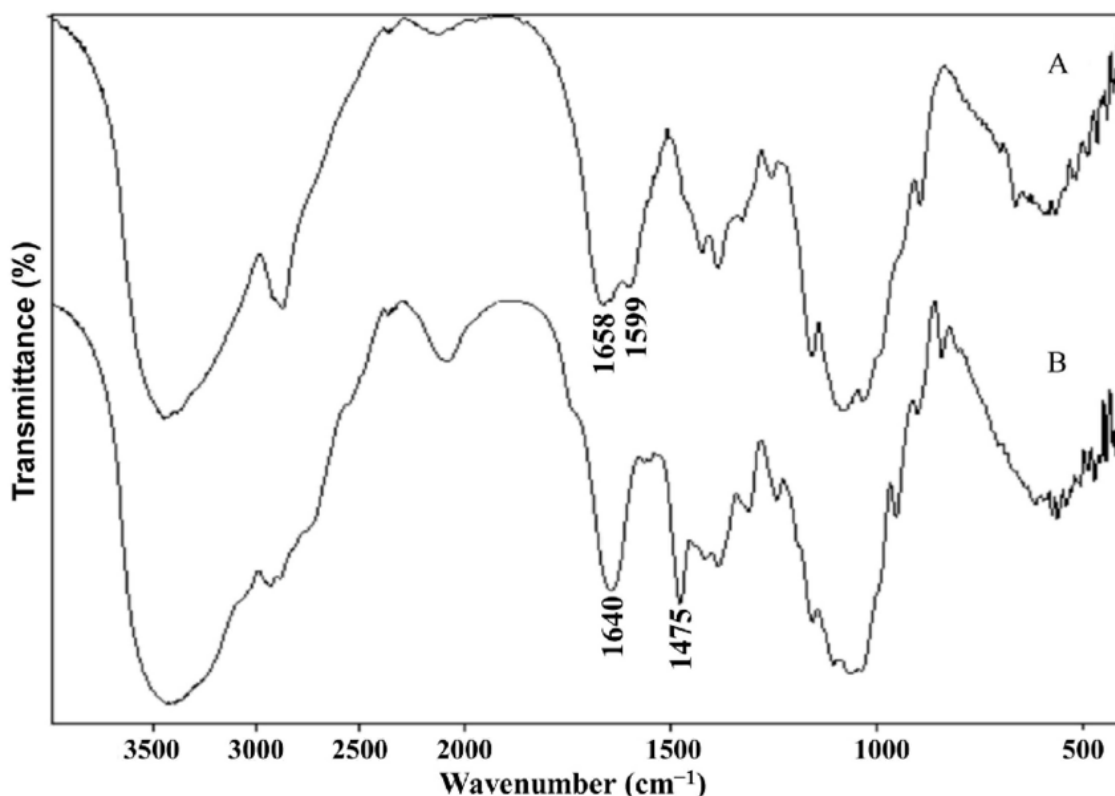


Obr. 4: 1H -NMR spektrum *N,N,N*-trimethylchitosanu získaného dvoustupňovou syntézou [19]

2.3.5.4 FTIR spektrum

Na Obr. 5 je porovnáno charakteristické spektrum N,N,N-trimethylchitosanu se spektrem chitosanu, která byla získána z infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Z vynesené závislosti transmitance na vlnočtu lze pozorovat strukturní změny TMC oproti chitosanu, lze tedy touto metodou stanovit přítomnost methylových skupin ve struktuře TMC.

Je patrné, že se při vlnočtu $1\,475\text{ cm}^{-1}$ objevil pás u FTIR spektra TMC připisovaný asymetrickému protažení vazeb C–H v methylových skupinách, což vypovídá o methylaci primární aminoskupiny vedoucí až ke vzniku kvartérní aminoskupiny. Pás s vlnočtem $1\,599\text{ cm}^{-1}$ u FTIR spektra chitosanu je naopak prisuzován valenčním vibracím N–H vazeb v primárních aminoskupinách chitosanu. Tento pás se nenachází ve spektru TMC, což naznačuje, že chitosanové primární aminoskupiny byly namethylovány [20].

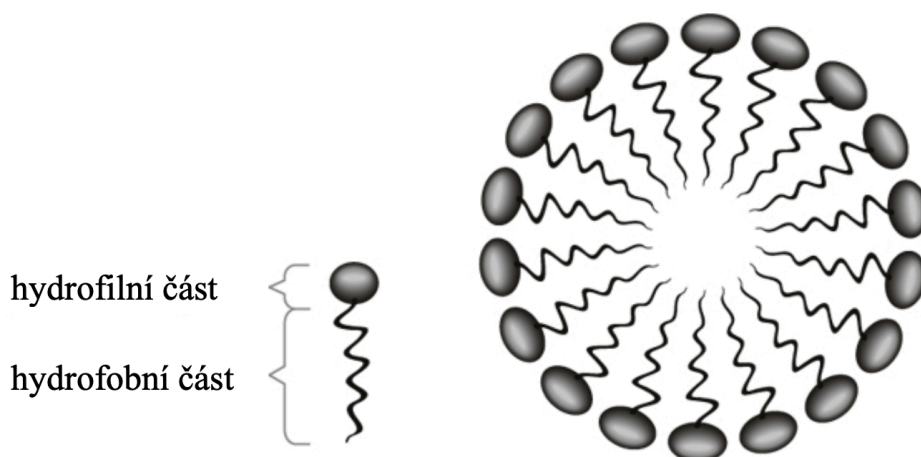


Obr. 5: FTIR spektrum: A) chitosan; B) N,N,N-trimethylchitosan [20]

2.4 Povrchově aktivní látky

Tenzid, povrchově aktivní látka, je organická látka, která je schopna se hromadit již při nízké koncentraci na fázovém rozhraní, a tím snižovat mezifázovou energii soustavy [21].

Molekula tenzidu má amfifilní neboli amfipatický charakter, skládá se z polární (lyofilní) a nepolární (lyofobní) části. V případě, že je rozpouštědlem voda, hovoříme o hydrofobní (nepolární) a hydrofilní (polární) části, které jsou zobrazeny na Obr. 6. Nepolární část molekuly tvoří dlouhý uhlíkový řetězec, polární část je tvořena výrazně polární skupinou, mezi kterou patří karboxylová skupina –COOH nebo skupina sulfonová –SO₃H [2].



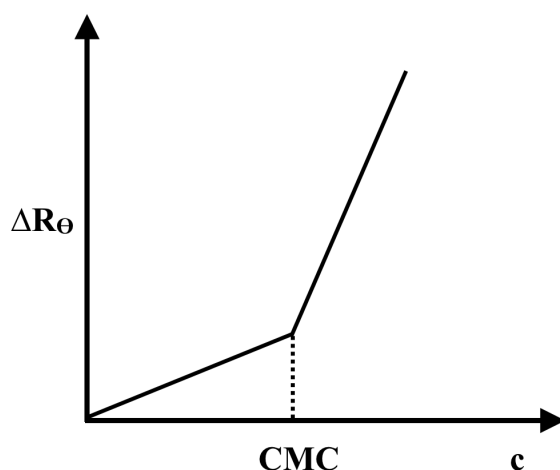
Obr. 6: Struktura micely ve vodě a popis hydrofobní a hydrofilní části tenzidu [22]

Nejčastěji používané dělení tenzidů je podle schopnosti elektrolytické disociace hydrofilní skupiny ve vodném prostředí. Tenzidy se tímto dělí na ionogenní (anionaktivní, kationaktivní, amfoterní) a neionické [21].

Amfifilní charakter tenzidů přináší schopnost redukce povrchového napětí roztoků a schopnost samovolné agregace na koloidy známé jako micely [23]. Micela je koloidní částice, která ve zředěném roztoku zaujímá kulovitý tvar. V kontaktu s vodou je povrch micely tvořen hydrofilními skupinami, zatímco hydrofobní řetězce směřují do středu, aby byly v minimálním kontaktu s vodou [2].

2.4.1 Kritická micelární koncentrace a její možné stanovení

Zředěné roztoky micelárních koloidů se vyznačují charakteristickým průběhem závislosti různých fyzikálních vlastností na koncentraci. V grafickém znázornění pozorujeme charakteristický zlom, který se projevuje pouze u roztoků tenzidů. K interpretaci tohoto zlomu se využívá koligativních vlastností a rozptylu světla, který vyjadřuje závislost Rayleighova poměru na koncentraci roztoku micelárního koloidu (viz Obr. 7).



Obr. 7: Závislost Rayleighova poměru na koncentraci roztoku micelárního koloidu se znázorněním zlomu kritické micelární koncentrace

Z průběhu této závislosti je zřejmé, že před zlomem jsou zdrojem rozptýleného světla jednotlivé molekuly rozpuštěné látky, zatímco rychlý vzrůst intenzity rozptylu za zlomem je způsoben vznikem asociátů (micel). Z toho vyplývá, že při určité koncentraci se z pravého

roztoku stává roztok koloidní. Tuto koncentraci nazýváme kritická micelární koncentrace (CMC z angl. *Critical Micelle Concentration*). Kritická micelární koncentrace je definována jako koncentrace, kdy po překročení její hodnoty dochází ke vzniku micel [2].

Jako hlavní hnací síla samovolného asociativního chování molekul povrchově aktivních látek ve vodě je považován hydrofobní efekt. Nicméně v případě ionických povrchově aktivních látek sehraávají při tvorbě micel důležitou roli i elektrostatické interakce mezi náboji disociovaných polárních skupin molekul tenzidu asociovaných v micely. Tyto interakce jsou odpuzivé, a tudíž působí proti micelizaci. Jestli v roztoku dojde k tvorbě micel tak závisí na převaze sil podporujících micelizaci (hydrofobní efekt) nebo účinkujících proti (elektrostatické repulze). Mezi hlavní parametry, které ovlivňují výslednou hodnotu CMC, patří teplota, tlak, molekulární struktura, náboj, pH, iontová síla, typ protiiontu [24].

Co se týče vlivu molekulární struktury tenzidu na výslednou hodnotu CMC, tak platí, že pokud bude hodnota CMC nižší, bude uhlíkový řetězec delší, a tím se zmenší odpuzivé síly, kterými na sebe působí hydrofilní skupiny na povrchu [2]. Také dochází k poklesu kritické micelární koncentrace s rostoucí koncentrací jednoduchých solí (např. chloridu sodného) ve vodném prostředí, protože jejich přítomnost zvyšuje iontovou sílu roztoku. Důvodem snížení CMC je stínící účinek elektrostatické repulze mezi hydrofilními částmi molekul tenzidu vyvolaný protiionty [24].

Pro kvantifikaci se využívá již zmíněný charakteristický průběh závislosti různých fyzikálních vlastností na koncentraci. Mezi tyto fyzikální vlastnosti, kromě rozptylu světla, dále patří povrchové napětí, elektrická vodivost nebo osmotický tlak [2].

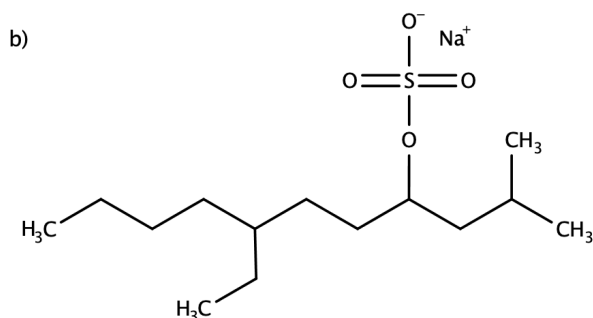
2.4.1.1 Stanovení CMC fluorescenční spektroskopii

Metoda stanovení kritické micelární koncentrace pomocí fluorescenční spektroskopie je založena na použití hydrofobního fluorescenčního barviva, které vykazuje odlišné vlastnosti v závislosti na vlastnostech solubilizačního média.

Jednou z možností pro stanovení CMC je využití fluorescenční sondy pyren (viz kapitola 2.6.2.1), která je senzitivní na polaritu prostředí, a tím vykazuje jiné fluorescenční chování v koloidní suspenzi s micelami a v roztoku pravém bez micel. Právě díky těmto změnám v chování pyrenu jsme schopni stanovit kritickou micelární koncentraci tenzidu v roztoku. Je však nutné zajistit, aby použitá koncentrace sondy nikterak neovlivnila chování povrchově aktivní látky [25].

2.4.2 Tetradecylsulfát sodný (STS), Niaproof®

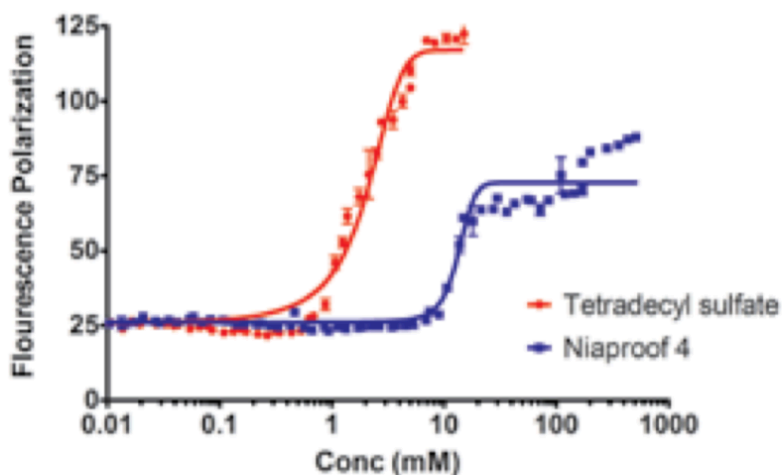
Tetradecylsulfát sodný je aniontové povrchově aktivní činidlo, které se vyskytuje ve formě bílé voskovité pevné látky. Molekula STS strukturně sestává z lineárního nepolárního alifatického řetězce (14 C) a polární (sulfátové) části. Zatímco Niaproof®, větvená forma STS, se skládá z větveného nepolárního alifatického řetězce (14 C) ukončeného polární (sulfátovou) skupinou. Konkrétně Niaproof® 4 obsahuje 26–28 hm. % vodný roztok Niaproof® a je k dostání jako bílá voskovitá kapalina se slabým zápachem [26]. Lineární a větvená struktura je uvedena na Obr. 8.

CCCCCCCCCCCCOS(=O)(=O)[O-].[Na+]

Obr. 8: Struktura: a) STS; b) Niaproof[®] 4

2.4.2.1 Vliv molekulové struktury STS a Niaproof® 4 na CMC

Jak je znázorněno na *Obr. 9*, dvě alkylsulfátové sloučeniny – Niaproof® 4 a tetradecylsulfát sodný – mají výrazně odlišné hodnoty CMC, přestože mají stejnou hmotnost a stejný počet uhlíků na svých alifatických koncích. Avšak Niaproof® 4 má na rozdíl od STS několik postranních řetězců umístěných na nepolárním uhlovodíkovém konci. Z toho vyplývá, že struktura alifatického nepolárního řetězce má významný vliv na kritickou micelární koncentraci. Rozvětvení alifatického uhlíkového řetězce vede k podstatnému zvýšení koncentrace potřebné pro tvorbu micel. Příčinou je pravděpodobně narušení těchto postranních molekul, které jsou vzájemně v těsném kontaktu, z důvodu tvorby micel [23].



Obr. 9: Vliv postranního větvení na alifatickém uhlíkovém řetězci na hodnotu CMC u alkylsulfátových povrchově aktivních látek [23]

2.4.2.2 Toxicita Niaproof® 4

Niaproof® 4 je považován za látku s mírnou perorální a kožní toxicitou. Testování perorální toxicity proběhlo na krysách, střední letální dávka LD₅₀ byla stanovena na 4,95 ml/kg tělesné hmotnosti. Test kožní toxicity byl proveden na králících, střední letální dávka LD₅₀ byla

stanovena na 3 ml/kg tělesné hmotnosti. Z výsledků studií dermatotoxicity však vyplynulo, že toxický účinek by se projevil až po dlouhodobé expozici velkého množství nezředěného roztoku [27].

2.4.2.3 Vlastnosti a využití Niaproof® 4

Zředěný Niaproof® 4 je toxinem pro endotelové buňky, podporuje tvorbu trombocytů, je schopen vyvolat hyperkoagulační stav, případně selektivní inhibici proteinu C [26].

Oproti lineární formě má Niaproof® 4 modifikované solubilizační vlastnosti, které z něj činí lepší penetrant v roztocích obsahujících nízké koncentrace rozpuštěných pevných látek [27].

Ve farmaceutickém průmyslu je Niaproof® 4 používán ke zlepšení baktericidních vlastností antiseptik, především je však využíván jako sklerotizující látka při skleroterapii. Skleroterapie je léčebná metoda, která se využívá pro léčbu vaskulárních anomálií, zejména žilních malformací a lymfatických malformací [26]. Slouží k cílené eliminaci intrakutánních, subkutánních a transfasciálních varikózních žil. Podstatou skleroterapie je intravenózní injikování sklerotizačního činidla do léze, které vyvolá ohraničenou destrukci žilního endotelu. Následuje tvorba trombu pevně lpícího k žilní stěně v místě destrukce endotelu. Konečnou fibrotizací vzniká vláknitá tkáň, což vede k částečné nebo úplné obliteraci žil [28].

Niaproof® 4 jako sklerotizační látka je konkrétně obsažen v léčivě Sotradecol®. Sotradecol® je aplikován při léčbě malých nekomplikovaných křečových žil dolních končetin [26]. Obecně jsou k dispozici 1% (10 mg/ml Niaproof® 4) a 3% (30 mg/ml Niaproof® 4) roztoky, jejichž použití je závislé na velikosti křečových žil. Množství sklerotizačního činidla v jedné injekci se pohybuje v rozmezí 0,5 až 2 ml, dávka pro jedno ošetření žil by však neměla překročit 10 ml. Niaproof® 4 jako účinnou sklerotizační látku též obsahují léčiva Tromboject®, Trombovar® a Fibro-Vein™ [29].

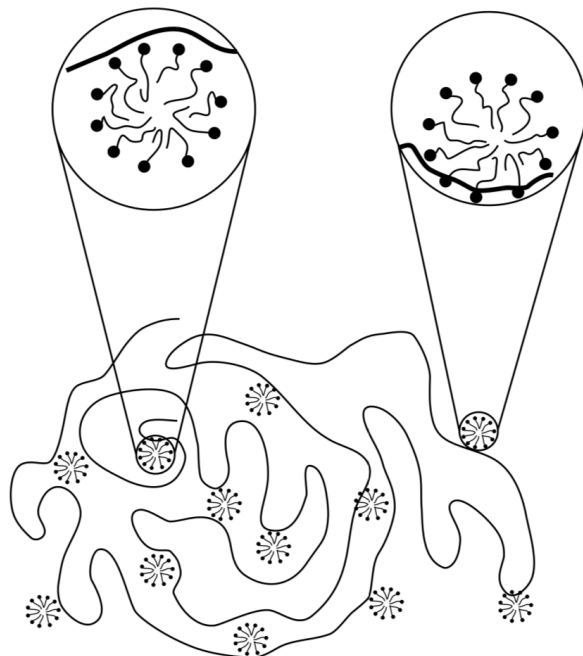
2.5 Interakce polykation–povrchově aktivní látka

Interakce mezi polykationem a aniontovou povrchově aktivní látkou je převážně způsobena vlivem elektrostatických sil, které vznikají díky opačným nábojům obou složek. Tato interakce připomíná interakci mezi makroionty a protiionty, která je popsána v kapitole 2.1, micely však představují daleko složitější systém [30].

Kromě elektrostatických sil zde figurují i interakce hydrofobní. Vzájemné působení mezi polykationem a záporně nabitou povrchově aktivní látkou vede ke vzniku komplexu, ve kterém jednotky polyelektrolytového řetězce tvoří elektrostatické vazby s molekulami tenzidu a zároveň nepolární části tenzidu stabilizují komplex prostřednictvím hydrofobních interakcí ve vodném prostředí. Tento agregační proces probíhá při výrazně nižší koncentraci povrchově aktivní látky, a to až o několik řádů, než je kritická micelární koncentrace této látky v rozpouštědle bez přítomnosti polyelektrolytu [31].

Vzniklé agregáty se svým chováním přirovnávají k tzv. „minimicelám“, neboli polyelektrolytem indukovaným micelám, které jsou zachyceny v oblastech s vysokým elektrostatickým potenciálem blízko makroiontu. Proces jejich vzniku je podobný běžné micelizaci v tom, že nepolární uhlíkový řetězec tenzidu má tendenci minimalizovat kontakt s vodou. Vytvořené „minimicely“ se silně vážou na polykation. Jejich distribuce podél řetězce však není rovnoměrná, jako je tomu u jednoduchých protiiontů, naopak tvoří lokalizované agregáty v oddělených částech řetězce polyelektrolytu [32].

Díky tomuto nepravidelnému uspořádání micel indukovaných polyelektrolytem, které jsou navázány na polyiontech polyelektrolytického řetězce, připomíná utvořený komplex svou strukturou perlový náhrdelník. Jak je vidět na *Obr. 10*, „minimicely“ se díky svému kulovitému tvaru podobají perlám, které jsou spojeny řetězcem polymeru [30].



Obr. 10: Struktura perlového náhrdelníku [30]

2.5.1 Kritická agregační koncentrace

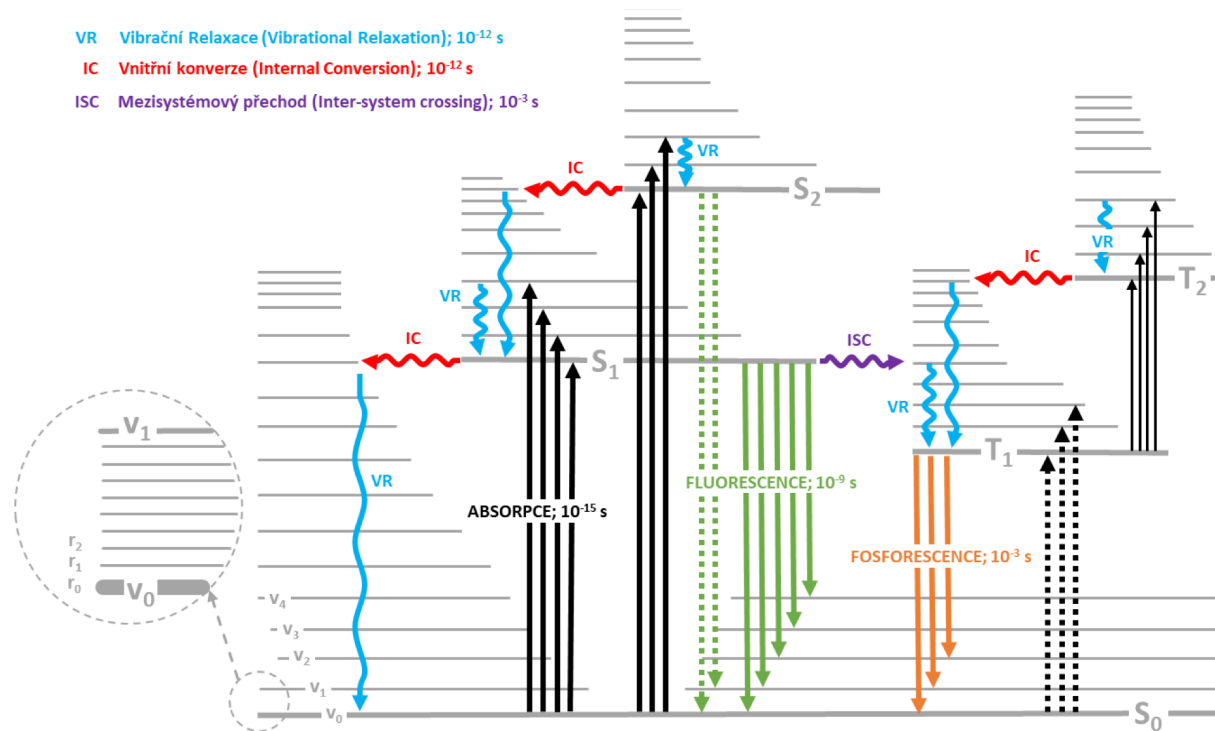
Hydrofobní efekt sehrává hlavní řídicí sílu pro samovolnou agregaci tenzidu v systému polyelektrolyt–tenzid. Vazba tenzidu na polyelektrolyt vykazuje podobnou závislost na délce alkylového řetězce, jako je známa u běžné micelizace.

Systém polyelektrolyt–tenzid lze tedy charakterizovat parametrem kritická agregační koncentrace (CAC z angl. *Critical Aggregation Concentration*), která je analogická kritické micelární koncentraci (CMC) v popisu chování roztoků tenzidu v přítomnosti polyelektrolytu. Vzniklé tenzidové agregáty jsou podobné micelám a formují se v úzkém koncentračním rozmezí. Podobně jako u CMC, hodnota CAC klesá se vzrůstající délkou uhlíkového řetězce tenzidu. Avšak CAC může být až o několik řádů nižší než CMC, což závisí na povaze polyiontu a tenzidového iontu [30, 32].

2.6 Fluorescence

Fluorescence je obecně jev, kdy po absorpci světla molekulou v základním stavu (S_0) dochází k excitaci elektronu. Tento elektron přechází z orbitalu s nejnižší energií, který představuje základní stav, do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Fluorescence obvykle probíhá z rovnovážné hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 . Fluorescence je výsledkem spinově dovoleného přechodu, ve kterém nedochází ke změně spinu, spiny obou elektronů jsou antiparalelní, a tudíž návrat do základního stavu probíhá rychlou emisí fotonu. Tento způsob odpovídá tvorbě jednoho ze dvou elektronově rozdílných excitovaných stavů.

K popisu energetických přechodů jako je absorpce fotonu, fluorescence či fosforescence slouží Perrin-Jabloňského diagram, který je ilustrován na *Obr. 11*. Zářivé procesy, při kterých se mění celková energie systému jsou znázorněny jako přímé šipky. Zatímco nezářivé procesy, u kterých se nemění celková energie systému, jsou označeny vlnovkami. Tyto procesy se realizují mezi vibračně-rotacími hladinami různých elektronových stavů. Příkladem je vnitřní konverze neboli přechod mezi nejnižší excitovanou hladinou na nejvyšší vibrační hladinu základní singletové hladiny a vibrační relaxace, což je proces, při kterém je energie excitovaného stavu převedena na vibrační energii, která je následně disipována ve formě tepla [33, 34].



Podle Vavilova pravidla jsou kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávislé na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace [36].

2.6.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou látky používané ve fluorescenční spektroskopii a fluorescenční mikroskopii. Ve své struktuře obsahují fluorofor, který je schopen absorbovat energii elektromagnetického záření o určité vlnové délce a následně přebytečné záření emitovat při vyšší vlnové délce. Fluorofor je tedy zodpovědný za fluorescenci.

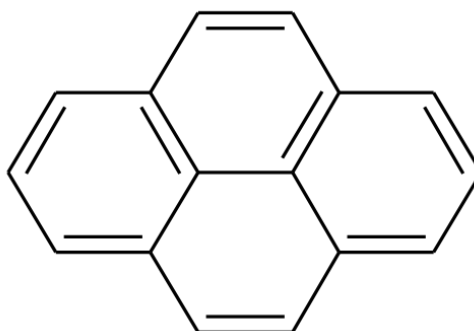
Fluorescenční sondy se dělí do tří skupin. První skupinu tvoří tzv. vnitřní sondy, které se přirozeně vyskytují v molekulách některých látek. Tyto látky vykazují autofluorescenci a patří mezi ně fluoreskující proteiny, flaviny, karotenoidy, aromatické aminokyseliny, koenzymy NADH a NADPH, chlorofyl atd. Jsou však využitelné pouze v malém okruhu experimentů.

Další skupinou sond jsou fyzikálně vázané fluorescenční sondy. Jde o malé organické molekuly, které se do zkoumaného systému přidávají nebo se v něm inkorporují na základě rozpustnosti či elektrostatické interakce. Tyto molekuly poté vykazují specifické fotofyzikální chování.

Poslední skupinou fluorescenčních sond jsou tzv. fluorescenční značky. Jedná se o molekuly fluoroforů, které jsou kovalentně vázané na zkoumanou látku. Využívají se ke značení molekul, které umožňuje molekulu zobrazit a sledovat [34].

2.6.2.1 Pyren

Pyren je organická polyaromatická fluorescenční sonda s vysokou symetrií, díky níž je velice citlivý na polaritu ve svém okolí. Jeho struktura je znázorněna na *Obr. 12*. Se symetrií je spojen fakt, že absorpční přechod $S_0 \rightarrow S_1$ je z hlediska symetrie zakázaný. Z tohoto důvodu jsou pak jednotlivé vibrační přechody v tomto pásu silně závislé na polaritě okolí molekuly. Hovoříme o tzv. Hamově efektu.



Obr. 12: Struktura pyrenu

U pyrenu překryvem zakázaného prvního a povoleného druhého excitovaného stavu dochází k interakci dipól-indukovaný dipól mezi pyrenem a prostředím. Tato interakce zapříčiňuje, že vibrační přechod 0-0 je silně závislý na polaritě rozpouštědla. Platí, že polární prostředí zvyšuje pravděpodobnost zářivého přechodu 0-0. Z toho vyplývá, že intenzita fluorescence tohoto přechodu roste s polaritou rozpouštědla. Vibrační maximum (I_1), které odpovídá právě přechodu 0-0, je v emisním spektru pyrenu lokalizováno při vlnové délce 373 nm. Referenčním pásem je přechod 0-2, který je charakterizován maximem intenzity (I_3) při 383 nm.

Pyren je dále schopen tvořit komplex zvaný excitovaný dimer neboli excimer, který vzniká spojením jedné excitované molekuly pyrenu a druhé molekuly v základním stavu. Na základě této interakce se tvoří tzv. sandwichový komplex. V důsledku jeho tvorby dojde ke ztrátě energie, tudíž i k posunutí maxima fluorescence excimeru k vyšším vlnovým délkám (470 nm). Tvorba excimeru je difuzně řízený proces, proto je jeho intenzita funkcí koncentrace pyrenu, mikroviskozity okolí, a dále poskytuje informace o rozdělení jednotlivých molekul pyrenu v hydrofobních jádrech u koloidních roztoků micel [37].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Studium interakcí chitosanu se záporně nabitými tenzidy

Charakterizaci interakce mezi chitosanem a aniontovým tenzidem dodecylsulfátem sodným (SDS) provedli M. Thongngam a D. J. McClements. Ve své studii využili tři metody, a to měření pomocí selektivní elektrody (SSE z angl. *Surfactant Selective Electrode*), isotermální titrační kalorimetrii (ITC z angl. *Isothermal Titration Calorimetry*) a turbidimetrii (měření zákalu). Výsledky z SSE metody a isotermální titrační kalorimetrie ukázaly, že průběh interakce mezi chitosanem a SDS je silně exotermní. Z turbidimetrického měření vyplynulo, že vzniklé komplexy jsou vysoce nerozpustné a silně rozptylují světlo. Závěr studie vede ke zjištění, že chitosan je schopen absorbovat přibližně 4 mM SDS na 0,1 hm. % chitosanu než dojde k jeho nasycení. Dále se ukázalo, že v přítomnosti 100 mM NaCl se koncentrace volného SDS zvyšuje, což negativně ovlivňuje schopnost tvorby komplexu chitosan–SDS [38].

V referenci [39] od Chatterjee a spol. byla řešena problematika tvorby chitosanového hydrogelu procesem gelace dodecylsulfátu sodného. Takto vytvořené systémy vykazovaly vyšší mechanickou pevnost a stabilitu než hydrogely tvořené pouze chitosanem bez SDS. Studie také prokázala, že koncentrace SDS v SDS–chitosanových gelech ovlivňuje adsorpční kapacitu chitosanu. Nejvyšší hodnota adsorpční kapacity byla stanovena při koncentraci SDS 4 g/l.

Autoři Fatimi a kol. se věnovali přípravě chitosanového termoreverzibilního gelu s větvenou formou STS (Niaproof®). Cílem jejich práce byla příprava injekčně podávaného gelu, který by byl nepropustný pro záření a uplatnil se v endovaskulární terapii. Termoreverzibilní gel zůstává při laboratorní teplotě a fyziologickém pH ve formě roztoku a na gel se mění po zahřátí na tělesnou teplotu. Na jeho přípravu byl použit chitosan (420 kDa, stupeň deacetylace 83 %), Niaproof® (27 hm. % roztok), Iopamidol (neionogenní roztok jodu o koncentraci 370 mg/ml) a β -glycerofosfátová sůl (β -GP). Iopamidol slouží ke zvýšení kontrastu po injikaci, β -glycerofosfátová sůl zabraňuje precipitaci systému. Začlenění Niaproof® do chitosanového gelu má na vzniklý systém podobný vliv jako dodecylsulfát sodný u SDS–chitosanového gelu. Bylo prokázáno, že se zvyšují mechanické vlastnosti, zrychluje se proces gelace a gely již nepropouští záření. Ideální homogenní hydrogel vhodný k injekční aplikaci obsahoval 2 hm. % chitosanu, 1–3 hm. % Niaproof®, 20 obj. % Iopamidolu a 12 hm. % β -GP [40].

3.2 Studium interakcí N,N,N-trimethylchitosanu a jejich následné využití v nosičových systémech

Účinnost většiny léků závisí na schopnosti přecházet přes buněčné membrány a dosáhnout cíleného intracelulárního prostředí. K efektivní distribuci léčivých látek byly navrženy specifické nosiče na základě spojení trimethylchitosanu a vhodné látky, které vede k tvorbě nanokomplexů.

Autoři Young a spol. se v referenci [41] zabývali přípravou nanočástic z trimethylchitosanu a chondroitin sulfátu, které by sloužily jako nosiče proteinů. Chondroitin sulfát je polyanion, který se nachází v pojivových tkáních a chrupavkách, se schopností vázat se na jádra proteinů. Trimethylchitosan byl syntetizován z chitosanu se stupněm deacetylace 93,8 %. Byly připraveny polyelektrolytové komplexy s kladným i záporným nábojem. Připravené

nanočástice nevykazovaly cytotoxicitu a jejich příprava proběhla v krátkém čase za mírných podmínek.

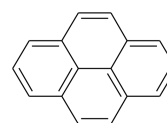
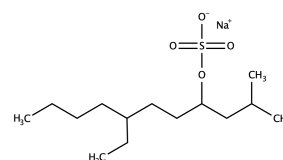
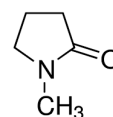
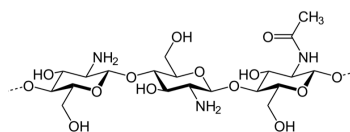
Nanočásticové systémy studovali také vědci z reference [42]. Jejich cílem byla příprava nosičových systémů na bázi trimethylchitosanu a thiamin pyrofosfátu (TPP), který účinkuje jako síťovací činidlo. Zabudováním nízkomolekulárního heparinu do vzniklého komplexu by se tyto systémy klinicky využily v léčbě vaskulárních poruch, jako jsou žilní trombózy nebo plicní embolie.

Díky výjimečným fyzikálně-chemickým vlastnostem trimethylchitosanu jsou TMC nanočástice stále studovány pro cílenou distribuci léčiv. Do struktury TMC nanočástic se již podařilo začlenit: antigeny chřipky [43], antigeny žloutenky B [44], monoklonální protilátky [45], inzulin [46], peptidy [47], DNA [48], RNA [49].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

Chitosan	250 kDa, DD = 75–85 % CAS: 9012-76-4 Sigma Aldrich s.r.o. č. šarže: SLBF6034V
N-methyl-2-pyrrolidon	CAS: 872-50-4 Sigma Aldrich s.r.o. č. šarže: 606021007
Methyljodid	CAS: 74-88-4 Sigma Aldrich s.r.o. č. šarže: 67692
Jodid sodný	CAS: 231-679-3 Lach-Ner s.r.o. č. šarže: 311400804
Chlorid sodný p.a.	CAS: 7647-14-5 Lach-Ner s.r.o. č. šarže: PP/2011/02369
Hydroxid sodný p.a.	CAS: 1310-73-2 Lach-Ner s.r.o. č. šarže: PP/2013/06111
Diethylether p.a.	CAS: 60-29-7 Lach-Ner s.r.o. č. šarže: PP/2010/06958
Aceton p.a.	CAS: 67-64-1 Lach-Ner s.r.o. č. šarže: PP/2013/00914
Ethanol p.a. (absolutní)	CAS: 64-17-5 Penta s.r.o. č. šarže: 1904150416
Niaproof® 4	27 hm. % vodný roztok CAS: 139-88-8 Sigma Aldrich s.r.o. č. šarže: MKBT1006V
Pyren	CAS: 1299-00-0 Honeywell-Fluka č. šarže: 430166/1
Deionizovaná voda	Miliphore, Purelab: ELGA

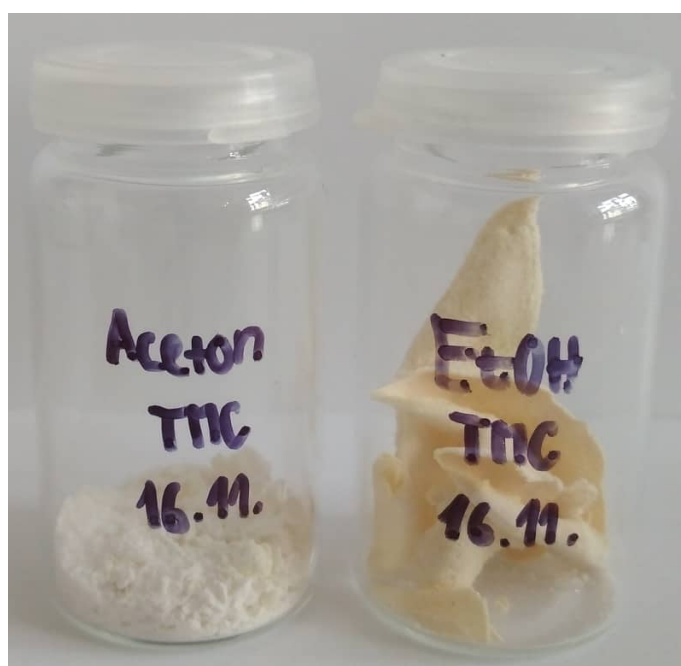


4.2 Syntéza N,N,N-trimethylchitosanu

Stěžejní součástí syntézy TMC se stal článek „*Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethylchitosan chloride*“ od A. B. Sievala [19], protože provedení syntézy bylo úspěšné, text obsahoval mnoho potřebných dat o průběhu syntézy a článek byl opětovně citován autory, kteří se taktéž zabývali syntézou TMC.

Tato reference [19] nabízí jednostupňovou metylaci, která vede k syntéze 35% kvarternizace, až metylaci třístupňovou, z níž lze získat 85% kvarternizovaný produkt. Pro přípravu TMC byla vybrána metylace dvoustupňová, při které se dosáhne 40–80% kvarternizace. Vybraný postup syntézy byl navíc doplněn o informace z jiných článků, které se na tuto práci odkazovaly.

Reference [50] poskytla informaci o velikosti částic chitosanu vstupujících do reakce, které se získají prosetím. Autoři z článku [51] preferovali použití acetonu místo ethanolu pro vysrážení produktu. Po otestování jedné syntézy s použitím ethanolu a druhé s použitím acetonu jsme optimalizovaly postup přípravy a dále již používaly aceton jako srážecí činidlo na základě lepších výsledků, které jsou zřetelné z Obr. 13. Z reference [52] byla potvrzena přesná hmotnostní a objemová data látek potřebných pro úspěšnou syntézu trimethylchitosanu. V poslední řadě byl výsledný postup přípravy námi optimalizován pro získání TMC až s 80% kvarternizací.



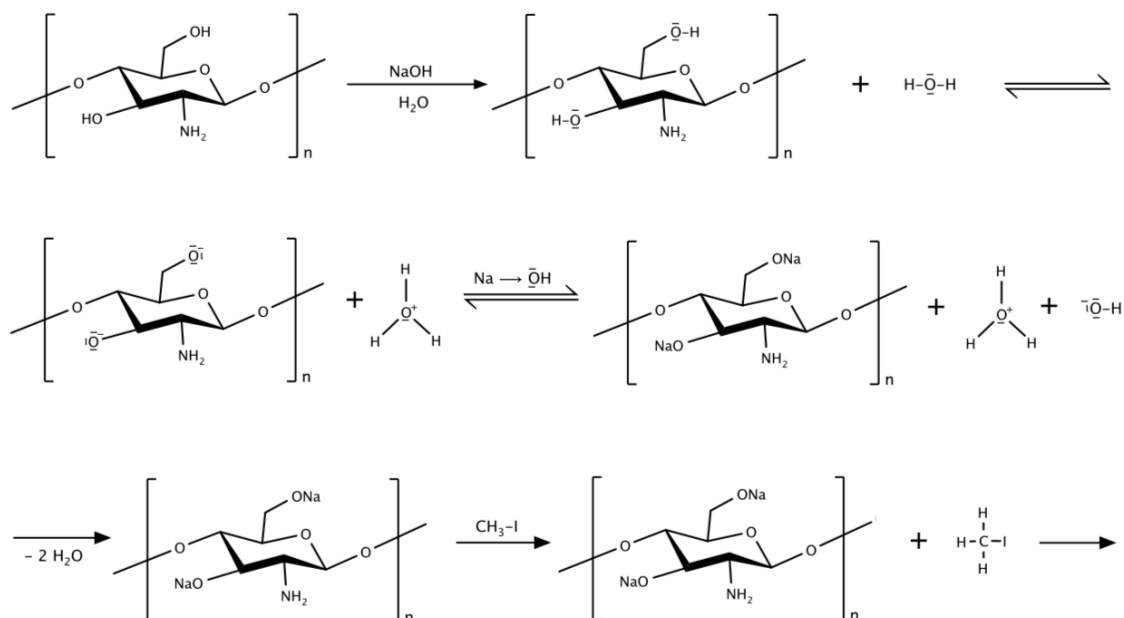
Obr. 13: Porovnání produktů získaných ze syntéz na bázi acetonu a ethanolu

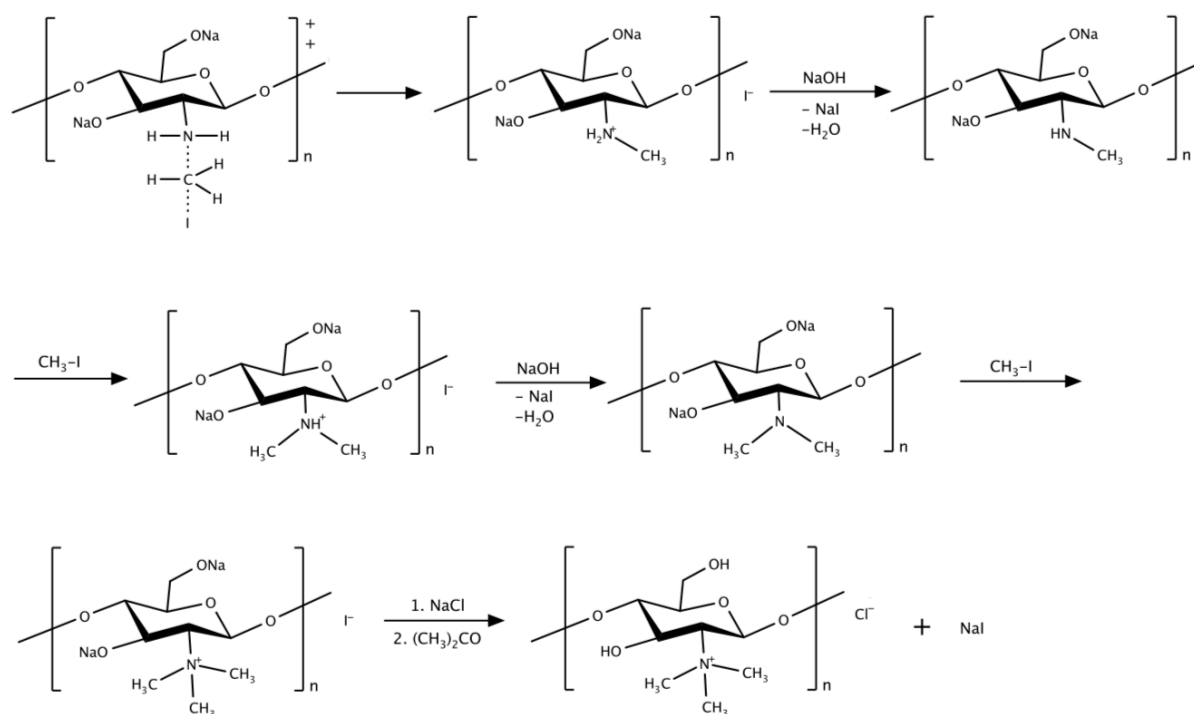
Při dvoustupňové syntéze byl použit chitosan se střední molekulovou hmotností 250 kDa, stupněm deacetylace 75–85 % a s velikostí částic menších než 200 μm , čehož bylo dosaženo prosetím chitosanových částic na sítích. V prvním kroku byly 2 g chitosanu smíchány s 80 ml NMP, který účinkuje jako rozpouštědlo. Tato směs byla ponechána v sonifikátoru po dobu 4 minut. Ke směsi bylo přidáno 4,8 g NaI, který napomáhal rozpustnosti. Reaktanty byly umístěny do dvouhrdlé baňky s kulatým dnem, kde probíhalo zahřívání ve vodní lázni do dosažení 60 °C za stálého míchání (300 ot/min) pomocí magnetického míchadla. Při 60 °C byl meziprodukt dispergován v 11 ml 15% vodného roztoku NaOH za vzniku soli.

Před přidavkem 11,5 ml methylačního činidla CH_3I byl spuštěn přívod vody do Liebigova chladiče a dále byla směs míchána a udržována při $60\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 minut. Produkt reakce byl vysrážen přidavkem 250 ml acetonu. Pro odstranění srážecího činidla byl produkt dvakrát promyt etherem na nuči s fritou. Výtěžek byl dále rozpouštěn v 80 ml NMP při stálé teplotě $60\text{ }^\circ\text{C}$, díky čemuž byl odstraněn naadsorbovaný ether. V tomto kroku se bílý produkt zbarvil do hněda a dále nebyl zcela rozpustný.

Přidavkem 4,8 g NaI, 11 ml 15% vodného roztoku NaOH a 7 ml CH_3I došlo k odbarvení a neúplnému rozpuštění pevných částic produktu. Pro 60% kvarternizaci reakce probíhala 90 minut za stálé teploty $60\text{ }^\circ\text{C}$. Produkt byl srážen 300 ml acetonu a získaný nažloutlý prášek byl centrifugován ($4,500 \times g$, 15 minut). Výtěžek byl rozdělen na dvě části. První část výtěžku byla dispergována ve 25 ml 10% vodného roztoku NaCl, druhá byla rozpuštěna ve sníženém množství NaCl, a to ve 20 ml 10% vodného roztoku NaCl. Reakce proběhly za účelem záměny jodidového aniontu za chloridový. Směsi byly míchány na automatické míchačce, po 90 minutách byly odebrány nažloutlé nerozpuštěné části. Roztoky byly opět sráženy acetonem, složky separovány centrifugací a výtěžky promyty dvakrát etherem. Finální produkty byly sušeny ve vakuové sušárně při teplotě $40\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 48 hodin.

Mechanismus reakce, podle kterého se řídila syntéza TMC, je znázorněn na *Obr. 14*. V prvním kroku, kdy se chitosan nachází v prostředí hydroxidu sodného, dochází k odštěpení vodíku z hydroxylových skupin v pozicích C_3 a C_6 chitosanu a k jeho následnému nahrazení sodíkovým kationtem. Působením methyljodidu na primární amin dochází k tvorbě sekundárního aminu mechanismem $\text{S}_\text{N}2$. V nadbytku tohoto methylačního činidla pokračuje substituce na dusíku až do vzniku kvartérní amonné soli. Přítomnost chloridu sodného v reakci způsobí výměnu jodidového aniontu za chloridový. Konečným vysrážením produktu nadbytkem acetonu dochází k převedení skupin $-\text{ONa}$ na skupiny hydroxylové.





Obr. 14: Schéma mechanismu syntézy *N,N,N*-trimethylchitosanu

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy

Pro studium micelizace Niaproof[®] 4 a interakce TMC s Niaproof[®] 4 byla použita fluorescenční sonda pyren. Při přípravě zásobního roztoku této fluorescenční sondy byl na analytických vahách navážen 1,0 mg pyrenu o molekulové hmotnosti 202,26 g/mol. Následně bylo toto množství kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml. Pro výslednou koncentraci pyrenu v zásobním roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M byla odměrná baňka doplněna po rysku roztokem acetonu.

4.3.2 Příprava vzorků pro měření CMC

Pro stanovení kritické micelární koncentrace byly připraveny zásobní roztoky Niaproof[®] 4 v deionizované vodě a v 0,15 M roztoku NaCl, který byl přichystán rozpuštěním 4,383 g NaCl v 500 ml deionizované vody. Příprava zásobního roztoku Niaproof[®] 4 se skládala z napipetování potřebného množství anionaktivního tenzidu a z rozpuštění tohoto množství v 0,15 M NaCl nebo v deionizované vodě. Připravený zásobní roztok byl ponechán na magnetické míchačce po dobu jednoho dne za účelem úplné homogenizace všech přítomných složek.

4.3.2.1 Stanovení CMC s fluorescenční sondou pyren

Koncentrační řady ke stanovení CMC obsahovaly fluorescenční sondu pyren a Niaproof[®] 4 rozpuštěný ve vodném nebo ve fyziologickém (0,15 M NaCl) roztoku. Fluorescenční sonda pyren se v objemu 60 μl pipetovala do suchých označených vialek. Těkvavé rozpouštědlo aceton, ve kterém byl pyren rozpuštěn, se nechalo z vialek odpařit. Po odpaření již bylo do vialek pipetováno přesné množství roztoku Niaproof[®] 4 dle dané koncentrační řady. Následně byl zbylý objem ve vialkách doplněn na 6 ml pomocí 0,15 M roztoku NaCl nebo

deionizované vody. Z tohoto důvodu byla výsledná koncentrace pyrenu ve vzorcích $1 \cdot 10^{-6}$ M. Nakonec byly vialky řádně zavíčkované, promíchány na vortexu a umístěny na třepačku po dobu dvou dnů pro úplnou homogenizaci všech přítomných složek. Výsledné koncentrační řady obsahovaly proměnlivou koncentraci Niaproof® 4 v rozsahu 0,01–50 mM pro vodné i fyziologické prostředí.

4.3.3 Příprava vzorků pro měření CAC

Pro studium interakce polykation–opačně nabitý tensid byly připraveny zásobní roztoky anionaktivního tensidu Niaproof® 4 a polykationtu N,N,N-trimethylchitosanu v deionizované vodě i ve fyziologickém roztoku NaCl.

Příprava zásobního roztoku trimethylchitosanu spočívala v navážení potřebného množství polymeru, aby koncentrace TMC činila 0,1 hm. %. Avšak výsledná koncentrace TMC v připravovaných roztocích (6 ml) pro studium interakce, kde se nacházel jak polymer (3 ml), tak tensid (3 ml), byla 0,05 hm. %. Navážené množství bylo rozpuštěno v deionizované vodě nebo v 0,15 M NaCl a necháno na magnetické míchačce po dobu jednoho dne z důvodu úplné homogenizace všech složek zásobního roztoku. Zásobní roztoky Niaproof® 4 byly připraveny stejným způsobem, jaký je uveden v kapitole 4.3.2 za účelem stanovení CMC.

4.3.3.1 Stanovení CAC s fluorescenční sondou pyren

Připravené zásobní roztoky byly následně použity k přípravě vzorků, na kterých byla studována interakce mezi TMC a Niaproof® 4. Nejdříve se postupovalo stejně jako v kapitole 4.3.2.1, bylo napipetováno 60 μ l roztoku pyrenu a rozpouštědlo aceton se nechalo odpařit. Po odpaření byly ze zásobního roztoku TMC do vialek napipetovány vždy 3 ml roztoku polymeru. Množství Niaproof® 4, které se odpipetovalo z příslušného zásobního roztoku, bylo závislé na výsledné koncentraci Niaproof® 4 ve vialce, zbytek do 3 ml byl doplněn 0,15 M roztokem NaCl nebo deionizovanou vodou. Vialky byly řádně zavíčkované, promíchány na vortexu a dva dny ponechány na třepačce opět pro úplnou homogenizaci všech přítomných složek. Výsledné koncentrační řady obsahovaly neměnnou koncentraci TMC (0,05 hm. %) a proměnlivou koncentraci Niaproof® 4 v rozsahu 0,000 5–3 mM pro vodné i fyziologické prostředí.

4.4 Metody a standardní vyhodnocení

4.4.1 Fluorescenční spektroskopie

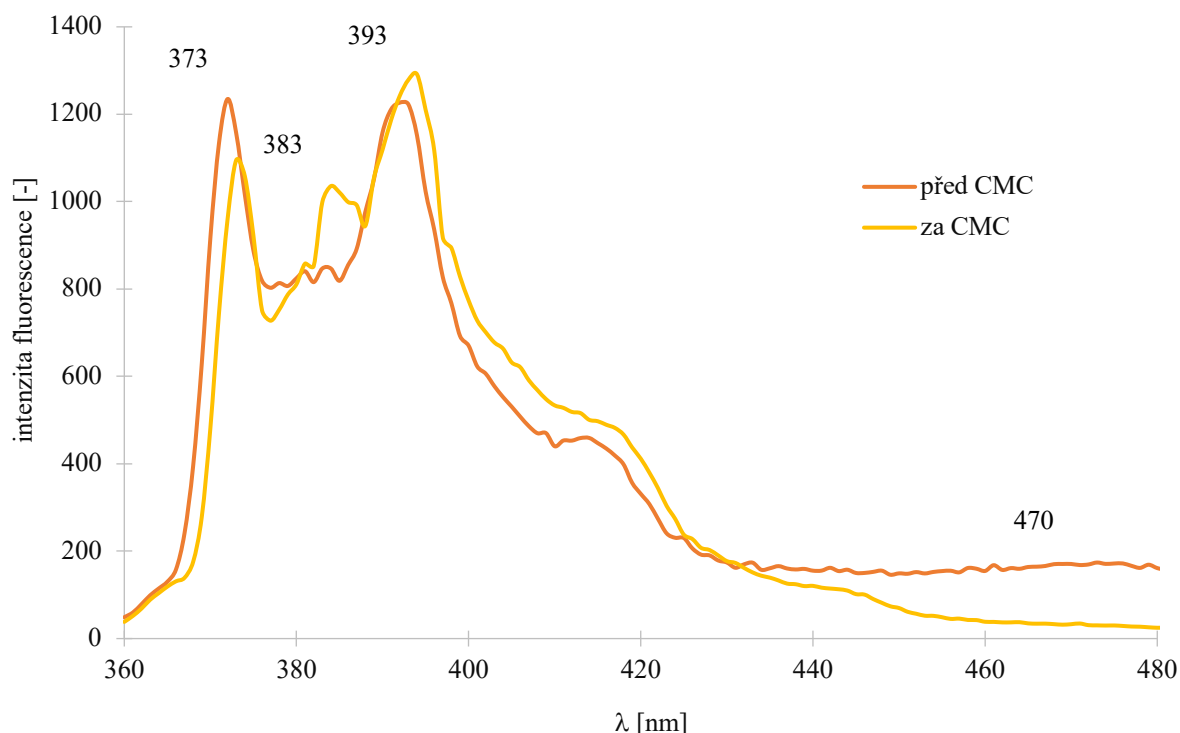
Pro měření fluorescenčních spekter za účelem stanovení kritické micelární a kritické agregační koncentrace byl využit fluorimetr FS5 – EDINBURGH INSTRUMENTS.

Při měření emisních spekter byl excitační monochromátor nastaven na 335 nm a spektrum se snímalo v rozmezí vlnových délek od 360 nm do 480 nm. Ve spektru byly zaznamenávány hodnoty intenzity fluorescence odpovídající dvěma maximům. První významné maximum je lokalizováno při 373 nm a jedná se o vibrační maximum pyrenu (I_1). Referenční pás k tomuto vibračnímu maximu odpovídá maximu intenzity (I_3) a lze vidět při 383 nm. Poměrem intenzity fluorescence prvního maxima (373 nm) a třetího maxima (383 nm) se získá emisní polaritní index ($EmPI$), který reaguje na polaritu prostředí.

Při měření excitačních spekter byl emisní monochromátor nastaven na 392 nm a spektrum se snímalo v rozmezí vlnových délek od 310 nm do 340 nm. Ve spektru byly opět zaznamenávány hodnoty intenzity fluorescence, tentokrát při vlnových délkách 333 nm

a 338 nm. Jejich poměr se nazývá excitační polaritní index (ExPI) a také reaguje na polaritu prostředí.

Dalším parametrem, kterým lze vyhodnotit chování pyrenu v prostředí, je poměr intenzity fluorescence při 373 nm, která odpovídá fluorescenci monomeru, a při 470 nm, která značí maximum intenzity fluorescence excimeru. Jedná se o poměr označovaný jako excimer ku monomeru (Ex:Mo), který odpovídá obsahu pyrenu v hydrofobních jádrech.



Obr. 15: Emisní spektrum pyrenu v závislosti na koncentraci tenzidu

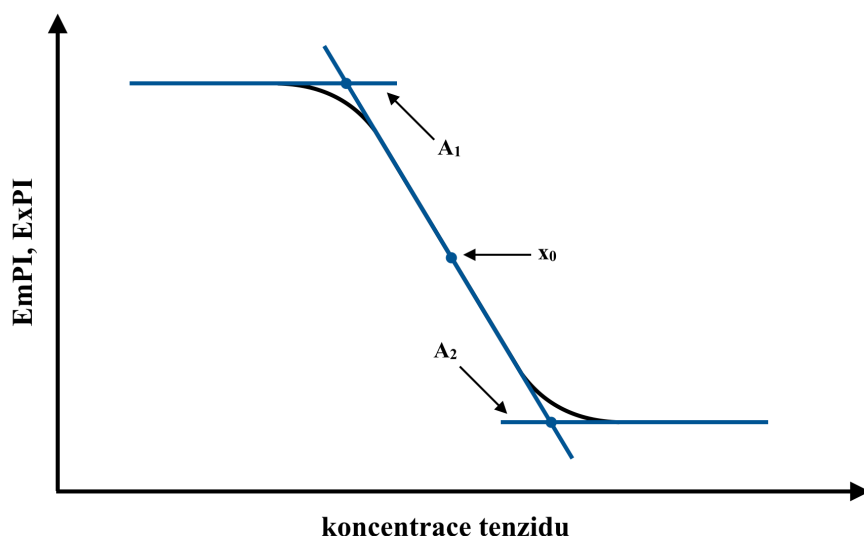
4.4.2 Emisní a excitační polaritní index

Závislost emisního a excitačního polaritního indexu na koncentraci v logaritmickém měřítku je charakteristická klesající sigmoidní křivkou. Prokládá se pomocí Boltzmannova modelu, který lze vytvořit pomocí programu OriginPro 8.1. Získaná Boltzmannova křivka má tvar:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (3)$$

kde proměnná y vyjadřuje EmPI nebo ExPI, nezávislá proměnná x odpovídá celkové koncentraci povrchově aktivní látky, x_0 je hodnota nezávislé proměnné v inflexním bodě a Δx udává strmost poklesu křivky (gradient). Parametr A_1 charakterizuje horní limitu sigmoidní křivky, naproti tomu parametr A_2 charakterizuje dolní limitu sigmoidní křivky.

Na Obr. 16 je vynesena Boltzmannova křivka spolu s charakteristickými parametry. Hodnota inflexního bodu x_0 odpovídá hodnotě kritické micelární a kritické agregační koncentraci. První zlom (A_1) ohraničuje začátek agregace, naopak druhý zlom (A_2) vymezuje konec agregace.

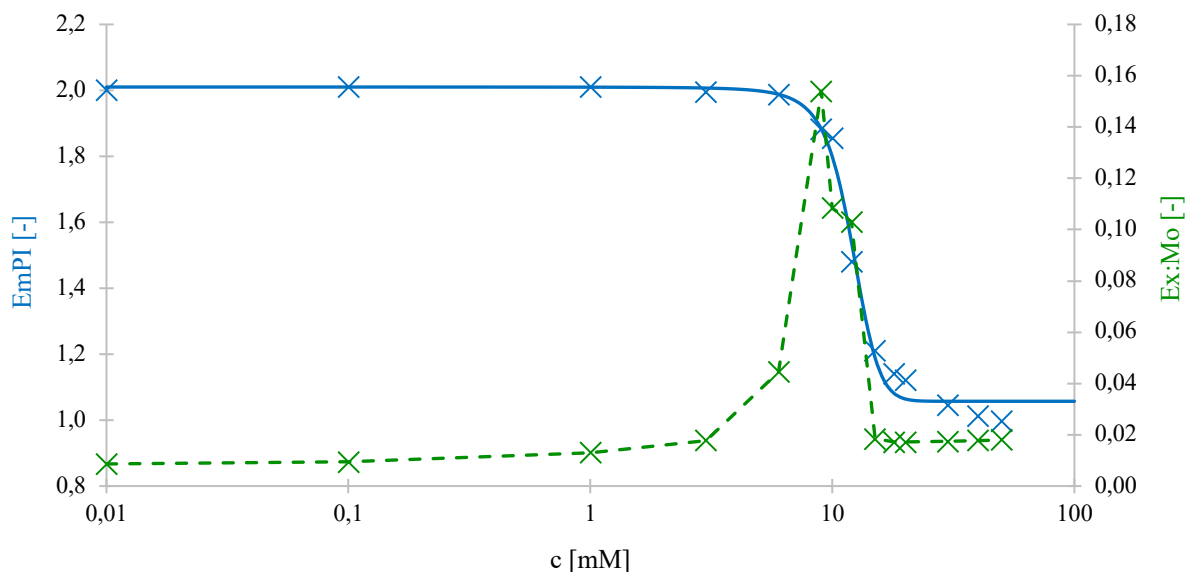


Obr. 16: Boltzmannova křivka

Pyren je velmi používanou fluorescenční sondou pro studium a charakterizaci koloidních systémů. Nicméně jeho použití může být limitováno možným ovlivněním jeho signálu řadou faktorů. Z hlediska struktury má pyren hydrofobní charakter, ale i přes to je ve vodě částečně rozpustný. Na základě těchto vlastností jsme schopni zaznamenat charakteristický signál před kritickou micelární koncentrací, kdy se pyren nachází ve vodném prostředí a povrchově aktivní látka se shromažďuje na mezifázovém rozhraní. Při zvyšování koncentrace povrchově aktivní látky v roztoku dochází k tvorbě micel, což způsobí zakoncentrování molekul pyrenu do hydrofobního prostředí, které se nachází v jádře micel.

Dosažení kritické micelární koncentrace a tvorby micel se v závislosti EmPI na koncentraci tenzidu, která je uvedena na Obr. 17, projevuje zlomem. Z hlediska fluorescenční sondy může být zlom v inflexním bodě a samotný sigmoidní průběh způsoben dvěma jevy. Jedním z nich jsou odlišné vlastnosti vznikajících micel od vlastností micel již stabilních za CMC. V oblasti zlomu se mohou tvořit premicelární agregáty, jejichž jádro je ještě stále přístupné pro vodu, jejich polarita tedy neklesá k tak nízkým hodnotám, jako je tomu u ustálených micel ve vodném roztoku, což se projeví pouze mírným klesáním intenzity EmPI a ExPI. V tomto případě se úplné micely tvoří až u bodu A_2 .

Druhým jevem je situace, při které již v inflexním bodě dochází ke vzniku plnohodnotných micel. Vlastnosti plnohodnotných micel se nemění bez ohledu na zvyšující se koncentraci tenzidu a důvodem pozvolně klesajících hodnot EmPI nebo ExPI je pouze jejich množství. Ihned po překročení kritické micelární koncentrace bude v systému přítomno pouze malé množství micel, které budou schopny solubilizovat jen část fluorescenční sondy. Skutečné hodnoty EmPI a ExPI ustálených micel se zaznamenají až v momentě, kdy bude v systému dostatečné množství agregátů potřebných k solubilizaci většiny fluorescenční sondy. Poté bude zkrácení pyrenem nacházejícím se stále ve vodném prostředí minimální.



Obr. 17: Závislost $EmPI$ a $Ex:Mo$ na koncentraci tenzidu Niaproof® 4 ve vodném prostředí. Hladkou plnou modrou čarou je znázorněna závislost Boltzmannova modelu pro data $EmPI$. Hladkou čárkovanou zelenou čarou je zobrazena závislost $Ex:Mo$ na koncentraci tenzidu.

4.4.3 Excimer a monomer

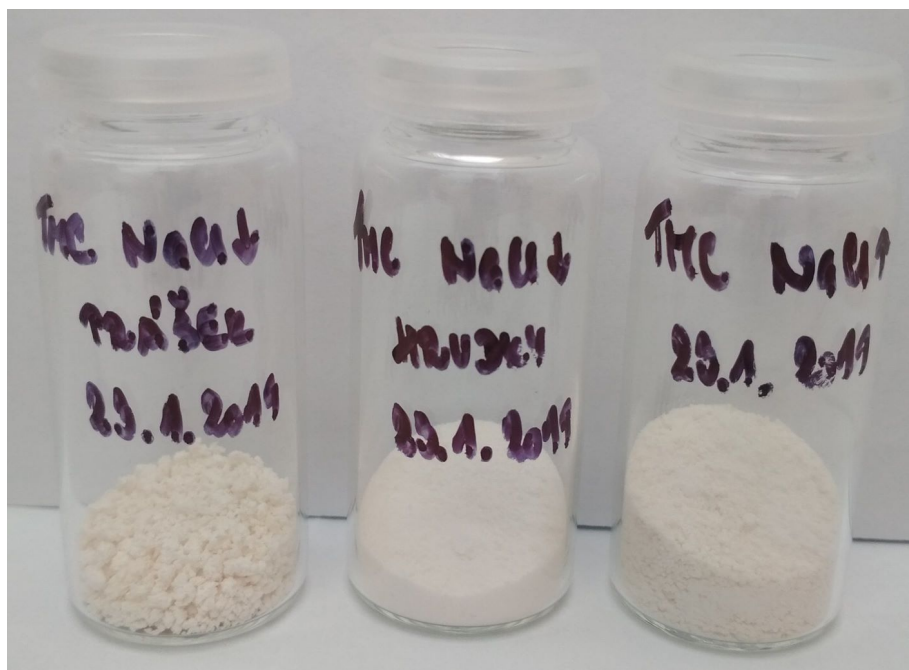
Kromě emisního a excitačního polaritního indexu slouží k popisu koloidního systému také poměr $Ex:Mo$, který charakterizuje tvorbu excimeru. Tento parametr je založen na jiném principu než současně měřené polaritní indexy. Molekula excimeru totiž vzniká difuzně řízeným procesem, jelikož se jedná o interakci dvou molekul pyrenu – jedné v základním a druhé v excitovaném stavu – které musí být v určité vzdálenosti od sebe, aby se excimer utvořil. Poté platí, že interpretací tohoto parametru získáváme informace ohledně mikroviskozity hydrofobního jádra.

Nejvyšší intenzitu signálu $Ex:Mo$ zaznamenáváme v oblasti CMC nebo CAC, v systému je nadbytek pyrenových molekul oproti malému množství micel, a proto se do hydrofobního jádra micel váže více molekul fluorescenční sondy, a tak je vznik excimeru velice pravděpodobný. Před CMC nebo CAC v systému nejsou přítomné žádné micely, tudíž i žádné hydrofobní oblasti, kam by se molekuly pyrenu zakonzentrovaly, excimer se tedy netvoří. Za CMC nebo CAC je v systému naopak mnoho micel a intenzita fluorescence excimeru klesá, protože dochází k rovnoměrné distribuci molekul pyrenu mezi hydrofobní domény micelárních jader. Všechny tyto skutečnosti jsou graficky znázorněny na Obr. 17, kde je vynesena závislost $Ex:Mo$ na koncentraci tenzidu Niaproof® 4 ve vodném prostředí.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace TMC produktů

Na základě úspěšné syntézy TMC, jejíž jednotlivé kroky jsou popsány v kapitole 4.2, byla získána bílá ve vodě rozpustná práškovitá až hrudkovitá forma produktů polymeru TMC (viz Obr. 18). Podařilo se nasyntetizovat 2,846 g TMC, který byl dispergován ve zvýšeném množství NaCl, 2,477 g TMC rozpuštěného ve sníženém množství NaCl (ve formě hrudek, které byly následně rozmělněny na prášek) a 0,975 g TMC (ve formě prášku), který byl také rozpuštěn ve sníženém množství NaCl. Po syntéze následovala charakterizace produktů pomocí nukleární magnetické rezonance a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací.



Obr. 18: Produkty syntézy *N,N,N*-trimethylchitosanu

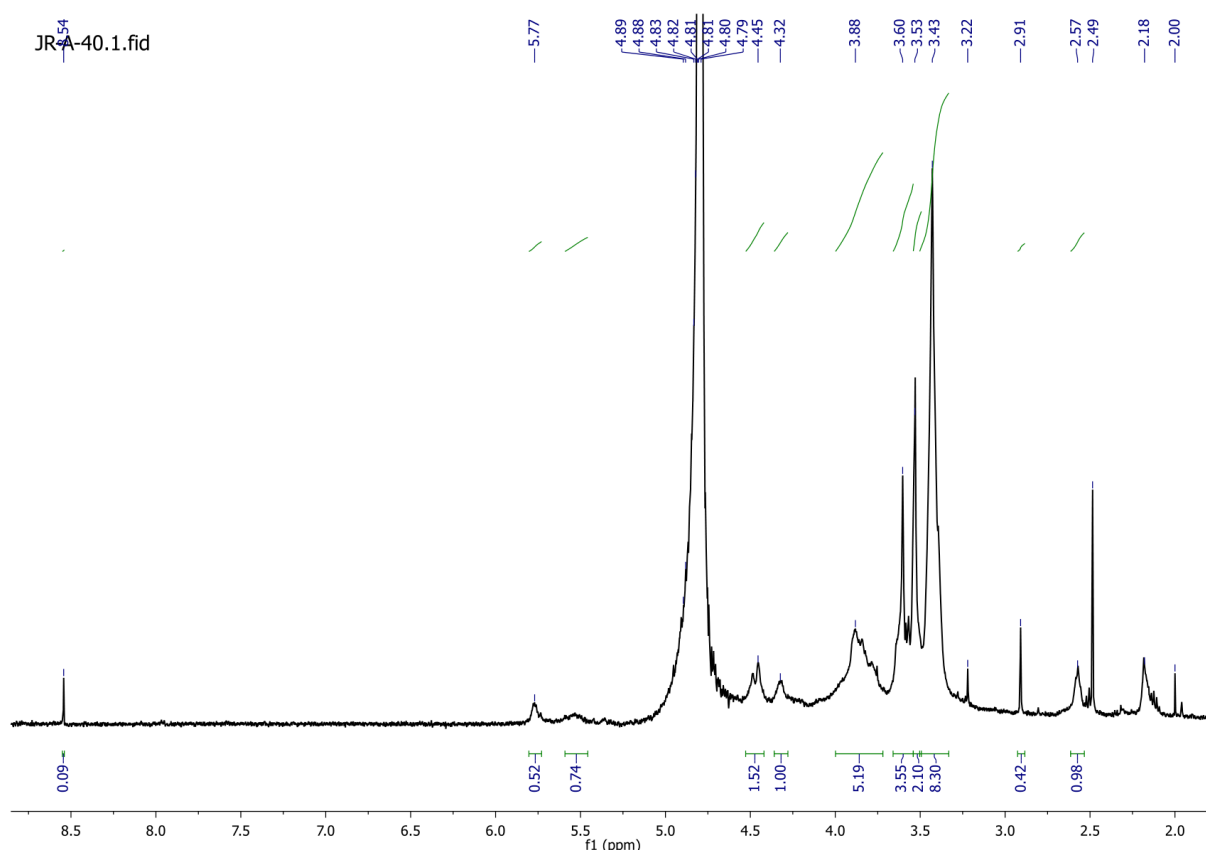
Jak již bylo zmíněno, trimethylchitosan lze charakterizovat stupněm kvarternizace a procentem *O*-methylace. Stupeň kvarternizace i procento *O*-methylace byly vypočteny z příslušných rovnic (1, 2), které jsou uvedeny v kapitole 2.3.5.2. Do rovnic byly dosazeny patřičné hodnoty zintegrovaných peaků získaných z ^1H -NMR spekter syntetizovaného TMC. Umístění charakteristických peaků pro jednotlivé funkční skupiny (viz Obr. 19) odpovídá teoretickým datům, které jsou uvedeny v článcích zabývajících se charakterizací TMC a rovněž v článcích, které byly využity pro přípravu TMC (viz kapitola 4.2). Tyto skutečnosti potvrzují úspěšnou syntézu trimethylchitosanu. Výsledné stupně kvarternizace a procenta *O*-methylace jednotlivých produktů syntézy jsou shrnuty v Tab. 2.

Tab. 2: Stupeň kvarternizace, procento *O*-methylace a výtěžek TMC polymerů

polymer	DQ [%]	DOM [%]	m [g]
TMC (↓ konc. NaCl – prášek)	61,3	61,6	0,975
TMC (↓ konc. NaCl – hrudky)	73,2	55,6	2,477
TMC (↑ konc. NaCl)	47,0	42,3	2,846

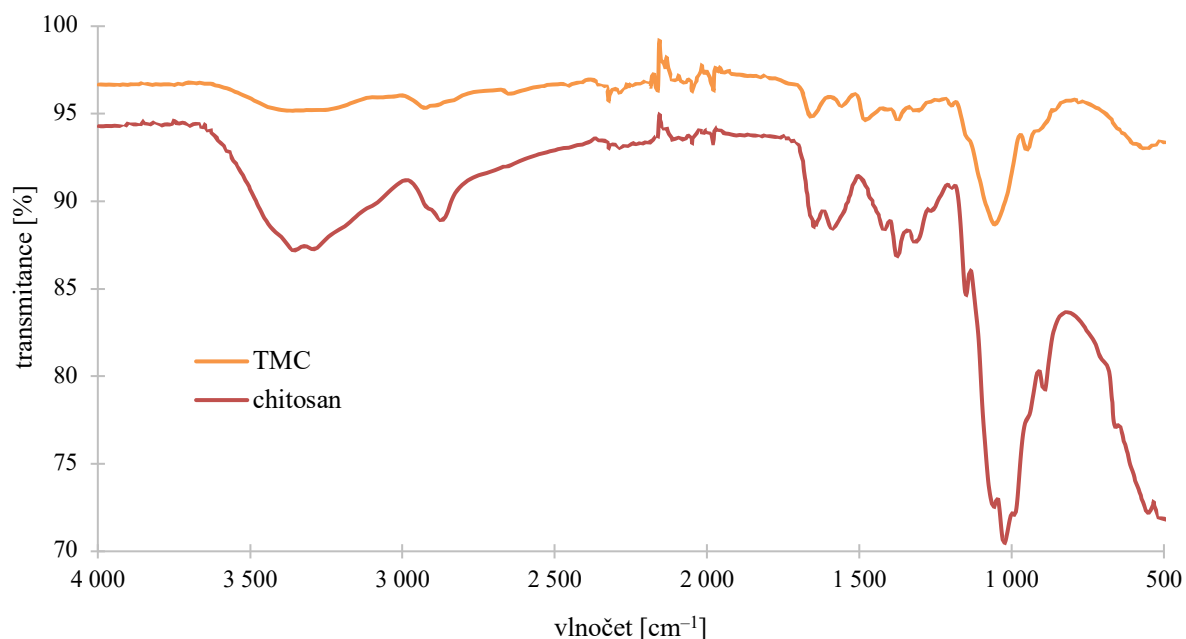
Z tabulky je patrné, že nejvyšší stupeň kvarternizace měla hrudkovitá forma TMC se sníženou koncentrací NaCl, a to 73,2 %. Naopak nejmenšího stupně kvarternizace bylo dosaženo u TMC se zvýšenou koncentrací NaCl. Článek [19], ze kterého byl vybrán postup přípravy TMC dvoustupňovou methylací, sliboval dosažení 40–80% kvarternizace, což se povedlo i potvrdilo.

Co se týče procenta O-methylace, TMC se zvýšenou koncentrací NaCl obsahoval nejméně namethylovaných hydroxylových skupin. Naproti tomu nejvyšší procento O-methylace s hodnotou DOM = 61,6 % bylo vyhodnoceno u práškovité formy TMC se sníženou koncentrací NaCl. Nicméně poměrově vůči stupni kvarternizace je na tom nejlépe TMC se sníženou koncentrací NaCl ve formě hrudek, který má zároveň nejvyšší stupeň kvarternizace.



Obr. 19: ^1H -NMR spektrum TMC se sníženou koncentrací NaCl (hrudky)

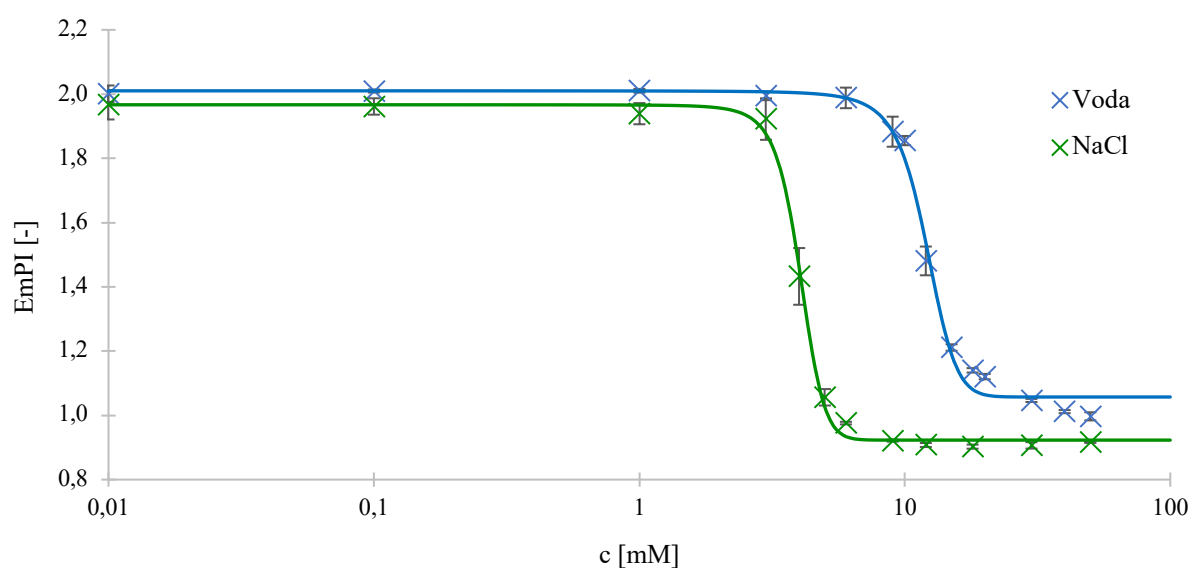
Všechny syntetizované produkty TMC polymeru byly také analyzovány prostřednictvím infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Výsledné spektrum je uvedeno na Obr. 20. Ve srovnání se spektrem chitosanu je ve spektru TMC pozorován charakteristický pás při vlně 1 479,13 cm^{-1} , který odpovídá methylované kvartérní aminoskupině, zatímco ve spektru chitosanu je při vlně 1 587,13 cm^{-1} vidět pás patřící primární aminoskupině. Umístění charakteristických pásů v získaném FTIR spektru je bez výrazných odchylek od teoretického FTIR spektra znázorněného na Obr. 5, z čehož vyplývá, že methylace chitosanu za vzniku N,N,N-trimethylchitosanu byla úspěšná. Všechny tři produkty trimethylchitosanu se v analýze nijak nelišily, proto je zde vyobrazeno jen jedno spektrum TMC.



Obr. 20: FTIR spektrum TMC s porovnáním pásů v podobě FTIR spektra chitosanu

5.2 Chování Niaproof® 4 ve vodných roztocích

Jedním z cílů experimentální části bakalářské práce bylo studium agregačního chování anionaktivního tenzidu Niaproof® 4 v přítomnosti polykationtu TMC. Za účelem kompletního porozumění interakce systému polykation–tenzid bylo však nejdříve zkoumáno chování samotného tenzidu Niaproof® 4 ve vodných roztocích, a to konkrétně v deionizované vodě a v 0,15 M NaCl. Studium micelizace proběhlo prostřednictvím fluorescenční spektroskopie s připravenými koncentračními řadami v rozmezí koncentrací 0,01–50 mM tenzidu Niaproof® 4. Všechny koncentrační řady byly připraveny třikrát z důvodu eliminace chyb a získání dat pro zjištění míry reprodukovatelnosti.



Obr. 21: Závislost $EmPI$ na koncentraci Niaproof® 4 ve vodě a v 0,15 M NaCl

Na *Obr. 21* je zobrazena závislost jednoho z výsledných parametrů měření, emisního polaritního indexu, na rostoucí koncentraci Niaproof® 4 ve vodě i v 0,15 M NaCl s proložením Boltzmannovým modelem za účelem zjištění přesné hodnoty CMC. Pro koncentrační řadu Niaproof® 4 ve vodném prostředí byla výsledná CMC stanovena na $(12,0 \pm 0,3)$ mM a pro fyziologické prostředí byla CMC stanovena na hodnotu $(4,03 \pm 0,05)$ mM. Pozorujeme zde výrazný rozdíl v hodnotě CMC. Je zřejmé, že vodný roztok chloridu sodného posunul CMC k nižším hodnotám, což potvrdilo skutečnost uvedenou v kapitole 2.4.1. U iontových povrchově aktivních látek přidavek soli podporuje micelizaci, protože zvyšuje iontovou sílu roztoku, což vede ke snížení CMC, jelikož zde figuruje výrazný vliv stínícího efektu protiiontů na elektrostatickou repulzi mezi skupinami $-\text{SO}_3\text{H}$.

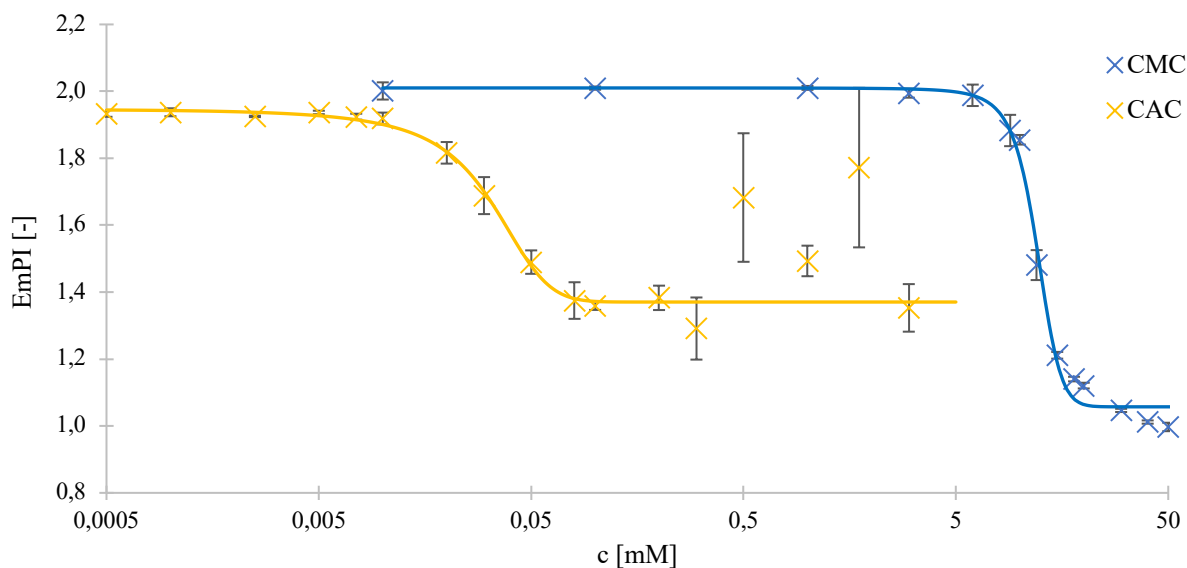
5.3 Interakce TMC–Niaproof® 4

Studium interakce anionaktivního tenzidu v přítomnosti polykationtu, v mém případě systému TMC–Niaproof® 4, proběhlo též prostřednictvím fluorescenční spektroskopie. Pro měření agregačního chování systému a stanovení CAC byly navrženy koncentrační řady s konstantní koncentrací TMC (0,05 hm. %) a proměnlivou koncentrací Niaproof® 4 (0,000 5–3 mM). Vzorky byly připraveny jak ve vodném prostředí, tak v prostředí 0,15 M roztoku NaCl. Všechny koncentrační řady byly připraveny třikrát z důvodu eliminace chyb a získání dat pro zjištění míry reprodukovatelnosti.

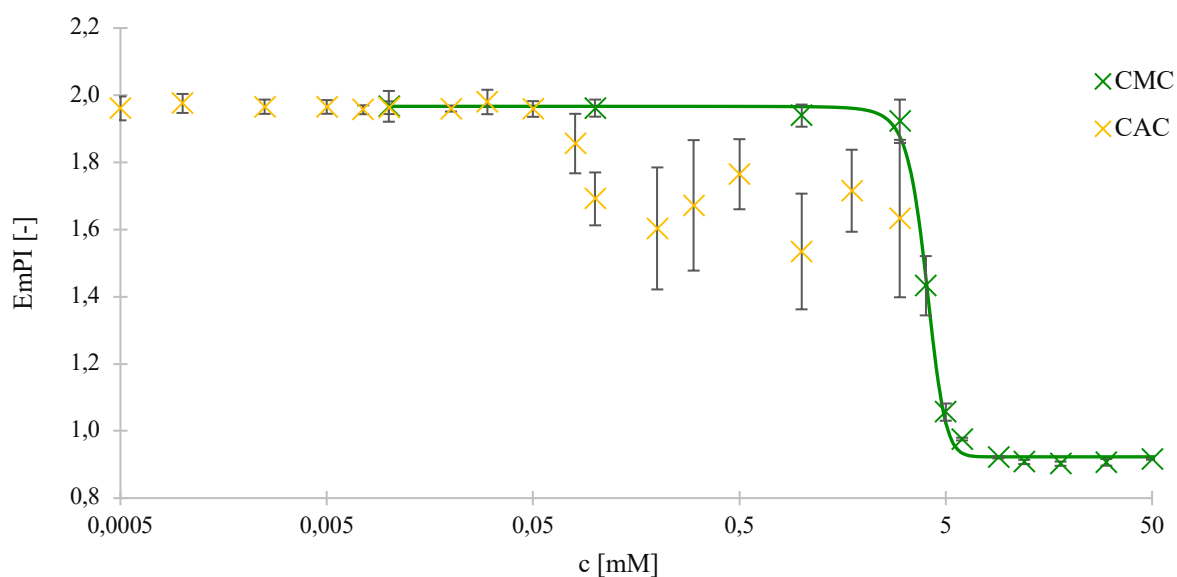
Byla prokázána interakce polykationtu trimethylchitosanu s anionaktivním tenzidem Niaproof® 4 ve vodném i fyziologickém prostředí za pomoci fluorescenční spektroskopie. Ve vzniklém komplexu tvoří polymerní řetězec TMC elektrostatické vazby s molekulami Niaproof® 4 a současně nepolární uhlíkový řetězec tenzidu stabilizuje komplex prostřednictvím hydrofobních interakcí.

Trimethylchitosan se svým kladným nábojem posunul CAC k nižším hodnotám oproti CMC jak ve vodném prostředí, tak v prostředí 0,15 M NaCl (viz *Obr. 22* a *Obr. 23*). Hodnota kritické agregační koncentrace pro systém TMC–Niaproof® 4 ve vodném prostředí byla pomocí proložením Boltzmannovým modelem stanovena na $(0,032 \pm 0,001)$ mM. Změna rozpouštědla má značný vliv na interakci, protože ve fyziologickém prostředí docházelo k agregaci při nižší koncentraci tenzidu. Agregace v 0,15 M roztoku NaCl proběhla při vyšší koncentraci tenzidu z důvodu zvýšené iontové síly, která způsobila snížení kladného náboje TMC, což vedlo ke snížení dosahu elektrostatických sil. U stanovení CMC tomu bylo přesně naopak, tam prostředí chloridu sodného snížilo koncentraci, při které dochází k micelizaci Niaproof® 4, protože přidavek soli podpořil stínící efekt protiiontů.

Také je z *Obr. 22* a *Obr. 23* patrné, že hodnoty EmPI za CAC nepoklesly na úroveň EmPI hodnot pro CMC. Je možné, že by při vyšších koncentracích povrchově aktivní látky v systému k tomuto poklesu došlo. Tento jev již nebyl předmětem studia.



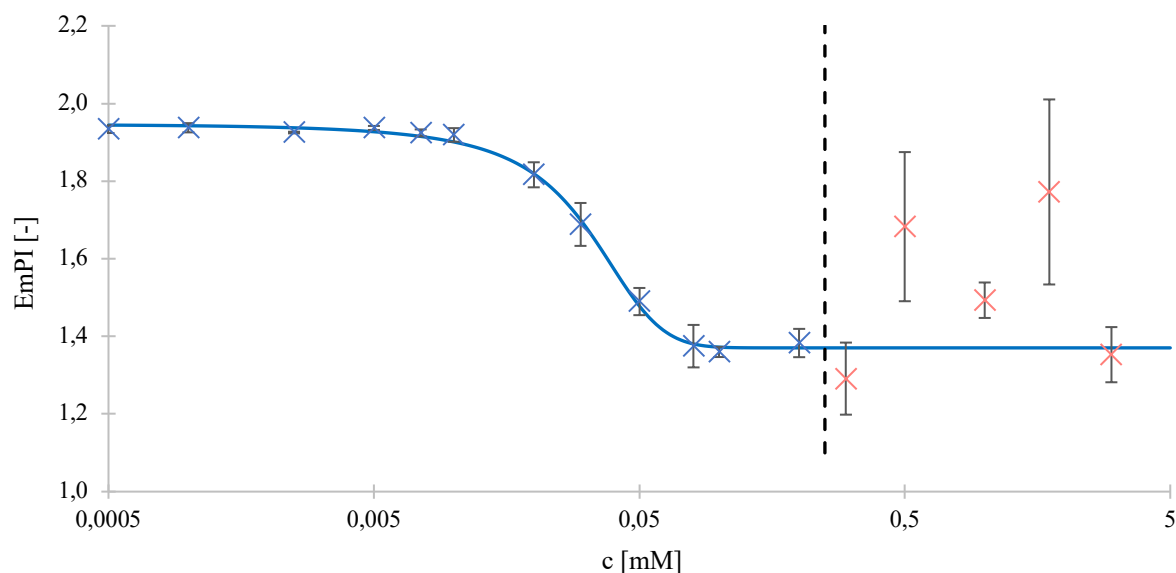
Obr. 22: Porovnání hodnot CMC a CAC na základě závislosti $EmPI$ na koncentraci tenzidu Niaproof® 4 ve vodném prostředí. Koncentrační řady pro stanovení CMC obsahovaly proměnlivou koncentraci tenzidu v rozsahu 0,01–50 mM. Koncentrační řady pro stanovení CAC obsahovaly konstantní koncentraci TMC (0,05 hm. %) a proměnlivou koncentraci tenzidu (0,000 5–3 mM).



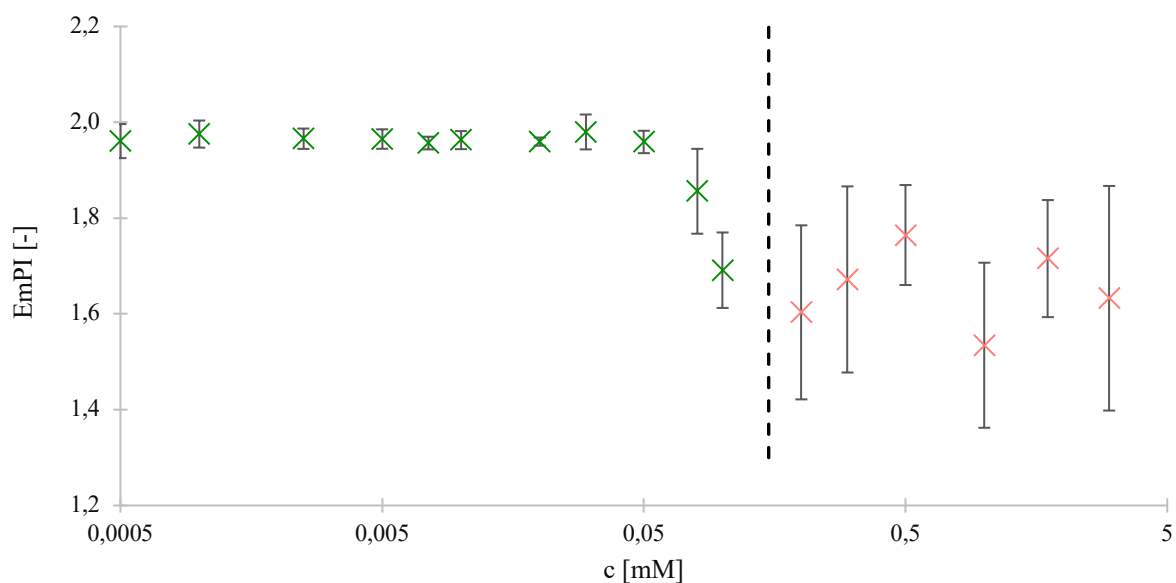
Obr. 23: Porovnání hodnot CMC a CAC na základě závislosti $EmPI$ na koncentraci tenzidu Niaproof® 4 ve fyziologickém prostředí. Koncentrační řady pro určení CMC obsahovaly proměnlivou koncentraci tenzidu v rozsahu 0,01–50 mM. Koncentrační řady pro určení CAC obsahovaly konstantní koncentraci TMC (0,05 hm. %) a proměnlivou koncentraci tenzidu (0,000 5–3 mM).

Z Obr. 24 a Obr. 25 je zřejmé, že při vyšších koncentracích tenzidu naměřené hodnoty výrazně kolísaly z důvodu fázové separace, jejíž začátek je označen svislou černou čárkovanou čarou. Tvorba sraženin a celkové zakalení vzorků (viz Obr. 26) byly vyvolány stabilizací systému, který již v oblasti kritické agregační koncentrace (u fyziologických roztoků) a za kritickou agregační koncentrací (u vodných i fyziologických roztoků) stabilitu ztrácel. V těchto oblastech byl pyren navázán i ve vzniklých micelách indukovaných polyelektrolytem,

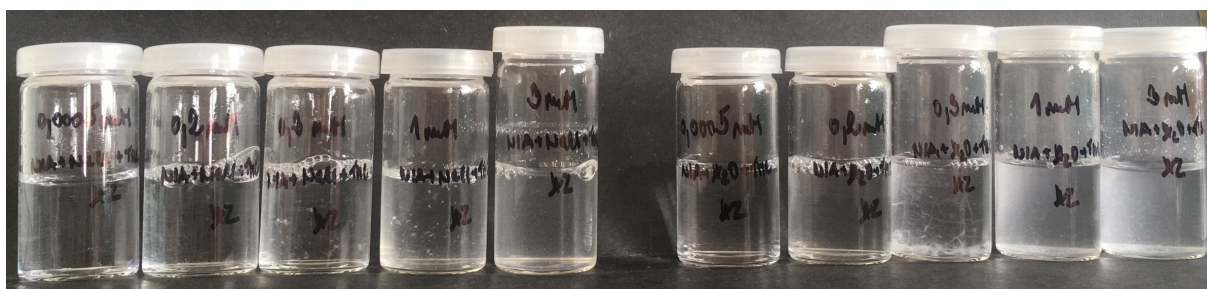
a tak nebylo možné určit jeho přesnou koncentraci v roztoku, tudíž jsou tyto hodnoty pro měření, interpretaci a studium nevyhovující. Jak již bylo zmíněno, u interakce systému TMC–Niaproof® 4 ve fyziologickém roztoku docházelo k fázové separaci už v oblasti CAC, tudíž bylo nemožné určit přesnou hodnotu CAC. Vyhodnocená hodnota CAC by byla výrazně zkreslena nepřesnými daty.



Obr. 24: Závislost $EmPI$ na rostoucí koncentraci Niaproof® 4 s konstantní koncentrací TMC (0,05 hm. %) ve vodném prostředí. Předěl svislou černou čárkovanou čarou značí začátek fázové separace, která je způsobena nestabilitou systému. Růžovou barvou jsou označeny hodnoty koncentrací, které jsou již pro měření a další interpretaci nevyhovující, protože při nich dochází k fázové separaci systému.



Obr. 25: Závislost $EmPI$ na rostoucí koncentraci Niaproof® 4 s konstantní koncentrací TMC (0,05 hm. %) ve fyziologickém prostředí. Předěl svislou černou čárkovanou čarou značí začátek fázové separace, která je způsobena nestabilitou systému. Růžovou barvou jsou označeny hodnoty koncentrací, které jsou již pro měření a další interpretaci nevyhovující, protože při nich dochází k fázové separaci systému.



Obr. 26: Porovnání vzorků vybraných koncentrací Niaproof® 4 za účelem pozorování změn. Vznik sraženin a celkové zakalení vzorků z důvodu fázové separace, která u systému ve vodném prostředí nastala po koncentraci tensidu 0,2 mM a u systému ve fyziologickém prostředí po koncentraci 0,1 mM.

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce byla příprava komerčně nedostupného N,N,N-trimethylchitosanu syntézou z chitosanu a následné studium agregačního chování syntetizovaného polykationtu v přítomnosti anionaktivního tenzidu Niaproof® 4. U anionaktivního tenzidu bylo nejdříve prozkoumáno micelizační chování a poté byla studována interakce polykation–aniontová povrchově aktivní látka. Průběh micelizace a agregace byl sledován prostřednictvím fluorescenční spektroskopie s fluorescenční sondou pyren.

Syntéza N,N,N-trimethylchitosanu z chitosanu proběhla za účelem získání biokompatibilního, biodegradabilního, netoxického a hlavně rozpustného polymeru v celém rozmezí pH. Zvýšená rozpustnost modifikovaného derivátu chitosanu již nelimituje uplatnění chitosanu především ve farmaceutickém průmyslu. Výsledný postup syntézy se opíral o poznatky celkem ze čtyř zdrojů a byl navíc námi optimalizován. Připravený TMC byl následně charakterizován pomocí dvou analýz. Na základě výsledných spekter z NMR a FTIR byla potvrzena patřičná struktura TMC, a tedy zdařilá methylace chitosanu. Kromě toho byl podle příslušných zintegrovaných peaků získaných z ^1H -NMR spekter určen stupeň kvarternizace a procento nežádoucí O–methylace všech polymerních produktů. Bylo zjištěno, že na výsledný produkt má výrazný vliv teplota reakční směsi, typ srážecího činidla i množství soli pro výměnu jodidového iontu za chloridový. Množství přidaného chloridu sodného se odráží ve výsledném procentu O–methylace i ve stupni kvarternizace, na který má negativní dopad.

Chování Niaproof® 4 ve vodném a fyziologickém prostředí bylo graficky znázorněno závislostí emisního polaritního indexu na rostoucí koncentraci tenzidu. Byl pozorován charakteristický sigmoidní průběh závislosti, který patří amfifilním povrchově aktivním látkám schopným tvořit micelární koloidy. Ze závislosti je zřetelné, kdy pyren přecházel z hydrofilního prostředí do hydrofobního jako důsledek vzniku micel. Bylo potvrzeno, že přídavek jednoduché soli podporuje micelizaci. V systému se zvýší iontová síla, která podpoří stínící účinek elektrostatické repulze mezi skupinami $-\text{SO}_3\text{H}$ tenzidu vyvolaný protiionty. Z toho plyne, že stanovená hodnota kritické micelární koncentrace byla ve fyziologickém prostředí nižší než ve vodném.

Interakce TMC–Niaproof® 4 probíhala při nižších koncentracích než micelizace samotného tenzidu v systému. Přítomnost kladně nabitého polymeru způsobila pokles koncentrace tenzidu, při které dochází k agregaci, jak ve vodném prostředí, tak v prostředí obsahujícím 0,15 M NaCl. Nicméně v oblasti kritické agregační koncentrace (u fyziologických roztoků) a za kritickou agregační koncentrací (u vodných i fyziologických roztoků) docházelo k fázové separaci, která byla vyvolána nestabilitou systému a vedla k jeho stabilizaci. V oblastech fázové separace se pyren navázal i do vzniklých micel indukovaných polyelektrolytem, což znemožnilo kvantifikaci CAC systému ve fyziologickém roztoku. Opět byl zaznamenán výrazný účinek chloridu sodného, tentokrát jeho přítomností došlo ke zvýšení CAC kvůli zvýšené iontové síle roztoku, která způsobila snížení kladného náboje TMC, a tím také snížení dosahu elektrostatických sil.

Co se týče využití studovaného systému TMC–Niaproof® 4 ve vodě, doporučila bych přímo koncentraci, při které docházelo k agregaci díky ideálnímu chování systému a absenci nevyhovujících sraženin. Také bych pro farmaceutické a medicínské aplikace volila interakci systému ve fyziologickém prostředí, protože má přibližně stejnou osmolaritu jako krevní

plazma, a tím nejvěrněji simuluje podmínky v lidském organismu. V tomto případě bych volila koncentrace v oblasti CAC, kde ještě nedocházelo k fázové separaci, nebo bych snížila koncentraci polykationtu, což by mohlo vést k částečné eliminaci fázové separace.

Niaproof® 4 je ve farmaceutickém průmyslu využíván jako sklerotizující látka při skleroterapii. Systém TMC–Niaproof® 4 by pro tuto aplikaci mohl poskytnout prodloužené uvolňování aktivní látky, a především větší stabilitu. V krevním řečišti by Niaproof® 4 zůstal vázaný na tíženém místě spolu s TMC. Navíc by se do nově vzniklých hydrofobních domén mohlo zabudovat další léčivo, které by podporovalo tuto léčebnou terapii. Také by tento systém mohl sám o sobě sloužit jako nosičový systém z hlediska schopnosti trimethylchitosanu rozvolnit těsné spoje mezi buňkami a netoxicity obou složek.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle práce byly splněny. Díky bakalářské práci byl navržen optimalizovaný postup syntézy N,N,N-trimethylchitosanu, dále práce přinesla poznatky o chování Niaproof® 4 ve vodných roztocích a o interakci TMC s Niaproof® 4 ve vztahu k potenciálním farmaceutickým aplikacím.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
2. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 198 s. ISBN 80-7080-422-X.
3. DAUTZENBERG, Herbert, Werner JAEGER, Joachim KÖTZ, Burkart PHILIPP, Christian SEIDEL a Dorothea STSCHERBINA. *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Munich: Hanser Publishers, 1994, 343 s. ISBN 1-56990-127-9.
4. AHMED, Shakeel a Saiqa IKRAM. *Chitosan: derivatives, composites and applications*. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2017. ISBN 978-111-9364-818.
5. NG, Xu Wen, Raghavendra C. MUNDARGI a Subbu S. VENKATRAMAN. Nanomedicine: Size-Related Drug Delivery Applications, Including Periodontics and Endodontics. *Nanotechnology in Endodontics* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015-2-24, 71-95 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1007/978-3-319-13575-5_5. ISBN 978-3-319-13574-8.
6. MOURYA, V. K., Nazma N. INAMDAR, Mohsen AMINI, Seyed Naser OSTAD, Elnaz Sadat SHAMSA, Morteza RAFIEE-TEHRANI a Farid Abedin DORKOOSH. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009, **20**(5), 1057-1079. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z. ISSN 0957-4530.
7. KHOR, Eugene. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, roč. 6, č. 4, s. 313-317. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00002-5.
8. YUAN, Youling, Betsy M. CHESNUTT, Warren O. HAGGARD a Joel D. BUMGARDNER. Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials* [online]. 2011, **4**(8), 1399-1416 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.3390/ma4081399. ISSN 1996-1944.
9. PAVINATTO, Adriana, Felipe J. PAVINATTO, Jorge A. de M. DELEZUK, Thatyane M. NOBRE, Adriano L. SOUZA, Sérgio P. CAMPANA-FILHO a Osvaldo N. OLIVEIRA. Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, **104**, 48-53. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.047. ISSN 09277765.
10. VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 56-65.
11. CHEUNG, Randy, Tzi NG, Jack WONG a Wai CHAN. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*. 2015, **13**(8), 5156-5186. DOI: 10.3390/md13085156. ISSN 1660-3397.

12. WU, Meiyang, Zhu LONG, Huining XIAO a Cuihua DONG. Recent research progress on preparation and application of N, N, N-trimethyl chitosan. *Carbohydrate Research*. 2016, **434**, 27-32. DOI: 10.1016/j.carres.2016.08.002. ISSN 00086215.
13. KULKARNI, Abhijeet D., Harun M. PATEL, Sanjay J. SURANA, Yogesh H. VANJARI, Veena S. BELGAMWAR a Chandrakantsing V. PARDESHI. N,N,N-Trimethyl chitosan: An advanced polymer with myriad of opportunities in nanomedicine. *Carbohydrate Polymers*. 2017, **157**, 875-902. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.041. ISSN 01448617.
14. DE BRITTO, Douglas, Lucimara Aparecida FORATO a Odílio B.G. ASSIS. Determination of the average degree of quaternization of N,N,N-trimethylchitosan by solid state ¹³C NMR. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2008, **74**(1), 86-91 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.01.021. ISSN 01448617.
15. VERHEUL, Rolf J., Maryam AMIDI, Steffen VAN DER WAL, Elly VAN RIET, Wim JISKOOT a Wim E. HENNINK. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N,N,N-trimethylated chitosan. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(27), 3642-3649 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.026. ISSN 01429612.
16. POLNOK, A., G. BORCHARD, J. C. VERHOEF, N. SARISUTA a H. E. JUNGINGER. Influence of methylation process on the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, **57**(1), 77-83 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00151-6. ISSN 09396411.
17. JINTAPATTANAKIT, Anchalee, Shirui MAO, Thomas KISSEL a Varaporn Buraphacheep JUNYAPRASERT. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2008, **70**(2), 563-571 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.06.002. ISSN 09396411.
18. THANOU, M. M., A. F. KOTZÉ, T. SCHARRINGHAUSEN, H. L. LUEBEN, A. G. DE BOER, J. C. VERHOEF a H. E. JUNGINGER. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, **64**(1-3), 15-25 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00131-5. ISSN 01683659.
19. SIEVAL, A. B., M. THANOU, A. F. KOTZÉ, J. C. VERHOEF, J. BRUSSEE a H. E. JUNGINGER. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 1998, **36**(2), 157-165 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/S0144-8617(98)00009-5. ISSN 0144-8617.
20. XU, Jiaojiao, Beihua XU, Dan SHOU, Xiaojing XIA a Ying HU. Preparation and Evaluation of Vancomycin-Loaded N-trimethyl Chitosan Nanoparticles. *Polymers* [online]. 2015, **7**(9), 1850-1870 [cit. 2019-04-08]. DOI 10.3390/polym7091488. ISSN 2073-4360.
21. ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické Listy*. 93, 1999, s. 421-427.

22. EVANS, D. Fennell a Håkan WENNERSTRÖM. *The colloidal domain: Where physics, chemistry, biology, and technology meet*. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, c1999. ISBN 978-0-471-24247-5.
23. HELD, Paul. Rapid Critical Micelle Concentration (CMC) Determination Using Fluorescence Polarization. *BioTek Instruments* [online]. Winooski, Vermont, 2014 [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: https://www.biotek.com/assets/tech_resources/CMC_App_Note.pdf.
24. STRNADOVÁ, Hana a Libor KVÍTEK. Vliv pufru na tvorbu micel vybraných povrchově aktivních látek. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 315-319.
25. GODDARD, E. D., N. J. TURRO, P. L. KUO a K. P. ANANTHAPADMANABHAN. Fluorescence probes for critical micelle concentration determination. *Langmuir* [online]. 1985, **1**(3), 352-355 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1021/la00063a015. ISSN 0743-7463.
26. Niaproof 4. *PHARMACOMPASS* [online]. New Delhi, India: Lepro Pharma Compass Opc Private Limited, 2008-02-05 [cit. 2019-02-22]. Dostupné z: <https://www.pharmacompass.com/chemistry-chemical-name/niaproof-4-23665770>.
27. NAS 4 - Niaproof® Anionic Surfactant 4. *NIACET CORPORATION* [online]. Niagara Falls, NY, 2013 [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: <https://www.niacet.com/wp-content/uploads/NAS4-Brochure-2013.pdf>.
28. STREJČEK, Jaroslav. Skleroterapie – základní principy a inovace metody. *ZAM – Zdravotnictví a medicína* [online]. 2004 [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/skleroterapie-zakladni-principy-a-inovace-metody-162716>.
29. KUMAR, Sachin. Niaproof 4. *Ndrugs* [online]. New York [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: <https://www.ndrugs.com/?s=niaproof-4>.
30. HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. /. Hoboken, NJ: John Wiley, 2003. ISBN 04-714-9883-1.
31. BAKEEV, Kirill N., Ekaterina A. PONOMARENKO, Tat'yana V. SHISHKANOVA, David A. TIRRELL, Alexander B. ZEZIN a V. A. KABANOV. Complexation of Amphiphilic Polyelectrolytes with Surfactants of the Same Charge in Water Solutions. *Macromolecules* [online]. 1995, **28**(8), 2886-2892 [cit. 2019-02-24]. DOI: 10.1021/ma00112a039. ISSN 0024-9297.
32. RADEVA, Tsetska. *Physical chemistry of polyelectrolytes*. New York: Marcel Dekker, 2001. Surfactant science series, v. 99. ISBN 08-247-0463-0.
33. LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
34. VENEROVÁ, Tereza. *Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul* [online]. Brno, 2013 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/25105>. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Centrum materiálového výzkumu. Vedoucí práce Miloslav Pekař.
35. MRAVEC, Filip. *Fluokurz*. Brno: Fakulta chemická VUT; [2018] [cit. 2019-05-06]; 72 s.

36. Fišar, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurověděch: Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. 2003. [cit. 2019-02-02].
37. MOHANAMBE, L. a S. VASUDEVAN. Aromatic Molecules in Restricted Geometries: Pyrene Excimer Formation in an Anchored Bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2006, **110**(29), 14345-14354 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1021/jp061695e. ISSN 1520-6106.
38. THONGNGAM, Masubon a D. Julian MCCLEMENTS. Characterization of Interactions between Chitosan and an Anionic Surfactant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(4), 987-991 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1021/jf034429w. ISSN 0021-8561.
39. CHATTERJEE, Sudipta, Tania CHATTERJEE a Seung H. WOO. A new type of chitosan hydrogel sorbent generated by anionic surfactant gelation. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(11), 3853-3858 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.089. ISSN 09608524.
40. FATIMI, Ahmed, Pascal CHABROT, Saoussen BERRAHMOUNE, Jean-Michel COUTU, Gilles SOULEZ a Sophie LEROUGE. A new injectable radiopaque chitosan-based sclerosing embolizing hydrogel for endovascular therapies. *Acta Biomaterialia* [online]. 2012, **8**(7), 2712-2721 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.04.006. ISSN 17427061.
41. YOUNG, Jenn-jong, Cheng-cheung CHEN, Ying-chuan CHEN, Kuang-ming CHENG, Hui-Ju YEN, Yu-chuan HUANG a Tsung-Neng TSAI. Positively and negatively surface-charged chondroitin sulfate-trimethylchitosan nanoparticles as protein carriers. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **137**, 532-540 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.095. ISSN 01448617.
42. PALIWAL, Rishi, Shivani R. PALIWAL, Govind P. AGRAWAL a Suresh P. VYAS. Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, **422**(1-2), 179-184 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.048. ISSN 03785173.
43. AMIDI, Maryam, Stefan G. ROMEIJN, J. Coos VERHOEF, Hans E. JUNGINGER, Laura BUNGENER, Anke HUCKRIEDE, Daan J. A. CROMMELIN a Wim JISKOOT. N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine* [online]. 2007, **25**(1), 144-153 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.06.086. ISSN 0264410X.
44. SUBBIAH, Ramesh, Prakash RAMALINGAM, Subramaniyan RAMASUNDARAM, Do Yang KIM, Kwideok PARK, Mohan K. RAMASAMY a Kyoung Jin CHOI. N,N,N-Trimethyl chitosan nanoparticles for controlled intranasal delivery of HBV surface antigen. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **89**(4), 1289-1297 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.04.056. ISSN 01448617.
45. VONGCHAN, Preeyanat, Yupanan WUTTI-IN, Warayuth SAJOMSANG, Pattarapond GONIL, Suchart KOTHAN a Robert J. LINHARDT. N,N,N-Trimethyl chitosan

- nanoparticles for the delivery of monoclonal antibodies against hepatocellular carcinoma cells. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **85**(1), 215-220 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.02.018. ISSN 01448617.
46. AMIDI, Maryam, Hubert C. PELLIKAAN, Anne H. DE BOER, Daan J. A. CROMMELIN, Wim E. HENNINK a Wim JISKOOT. Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2008, **68**(2), 191-200 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.05.007. ISSN 09396411.
 47. WANG, Siling, Tongying JIANG, Mingxin MA, Yanchen HU a Jinghai ZHANG. Preparation and evaluation of anti-neuroexcitation peptide (ANEP) loaded N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles for brain-targeting. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, **386**(1-2), 249-255 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.002. ISSN 03785173.
 48. ZHAO, Xin, Lichen YIN, Jieying DING, Cui TANG, Shaohua GU, Chunhua YIN a Yumin MAO. Thiolated trimethyl chitosan nanocomplexes as gene carriers with high in vitro and in vivo transfection efficiency. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **144**(1), 46-54 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.022. ISSN 01683659.
 49. ZHANG, Jing, Cui TANG a Chunhua YIN. Galactosylated trimethyl chitosan–cysteine nanoparticles loaded with Map4k4 siRNA for targeting activated macrophages. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(14), 3667-3677 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.079. ISSN 01429612.
 50. THANOU, Maya M, J.Coos VERHOEF, Stefan G ROMEIJN, J.Fred NAGELKERKE, Frans W.H.M MERKUS a Hans E JUNGINGER. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 1999, **185**(1), 73-82 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00126-X. ISSN 0378-5173.
 51. MITHUN, U., B. VISHALAKSHI a J. KARTHIKA. Preparation and characterization of polyelectrolyte complex of N,N,N-trimethyl chitosan/gellan gum: evaluation for controlled release of ketoprofen. *Iranian Polymer Journal* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, **25**(4), 339-348 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1007/s13726-016-0425-9. ISSN 1026-1265.
 52. JANG, Keum-Il, Ji-Soo LEE a Hyeon LEE. Physicochemical properties and cell permeation efficiency of L-ascorbic acid loaded nanoparticles prepared with N-trimethyl chitosan and N-triethyl chitosan. *Food Science and Biotechnology* [online]. Heidelberg: The Korean Society of Food Science and Technology, 2014, **23**(6), 1867-1874 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1007/s10068-014-0255-5. ISSN 1226-7708.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

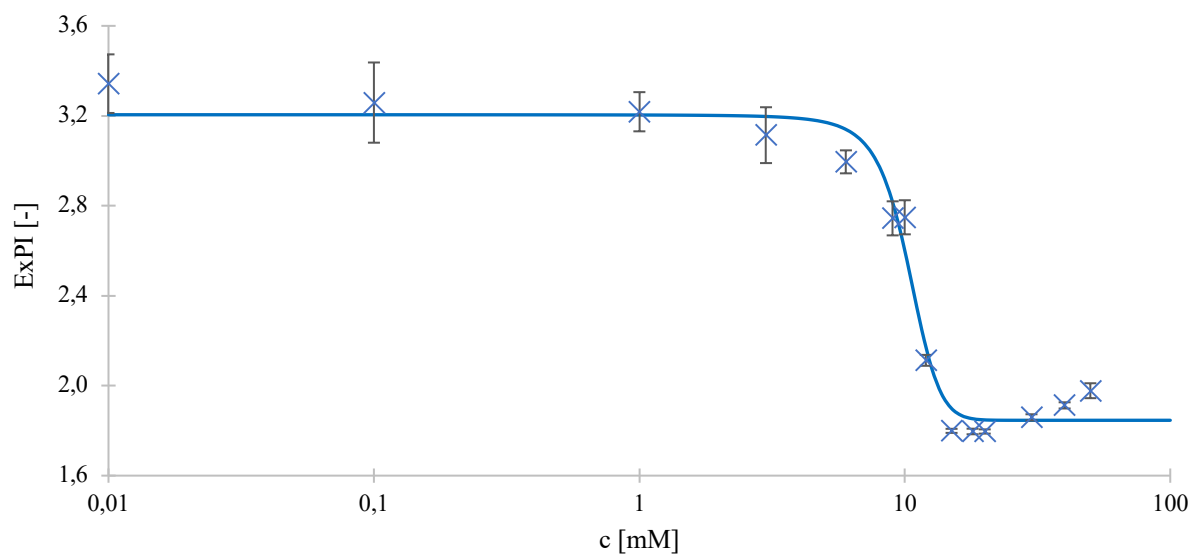
<i>Zkratka</i>	<i>Význam</i>
CAC	kritická agregační koncentrace
CMC	kritická micelární koncentrace
DA	stupeň acetylace
DD	stupeň deacetylace
DMC	N,N-dimethylchitosan
DMS	dimethylsulfát
DOM	procento O-methylace
DQ	stupeň kvarternizace
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitační polaritní index
Ex:Mo	excimer ku monomeru
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HTCC	N-([2-hydroxy-3-trimethylammonium])propylchitosanchlorid
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% inhibici daného parametru
ITC	isotermální titrační kalorimetrie
LD ₅₀	střední letální dávka
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance
SDS	dodecylsulfát sodný
S _N 2	substituce nukleofilní bimolekulární
SSE	selektivní elektroda
STS	tetradecylsulfát sodný
TEER	transepitelární elektrická rezonance
TMC	N,N,N-trimethylchitosan
TPP	thiamin pyrofosfát
β-GP	β-glycerofosfátová sůl

8.2 Seznam symbolů

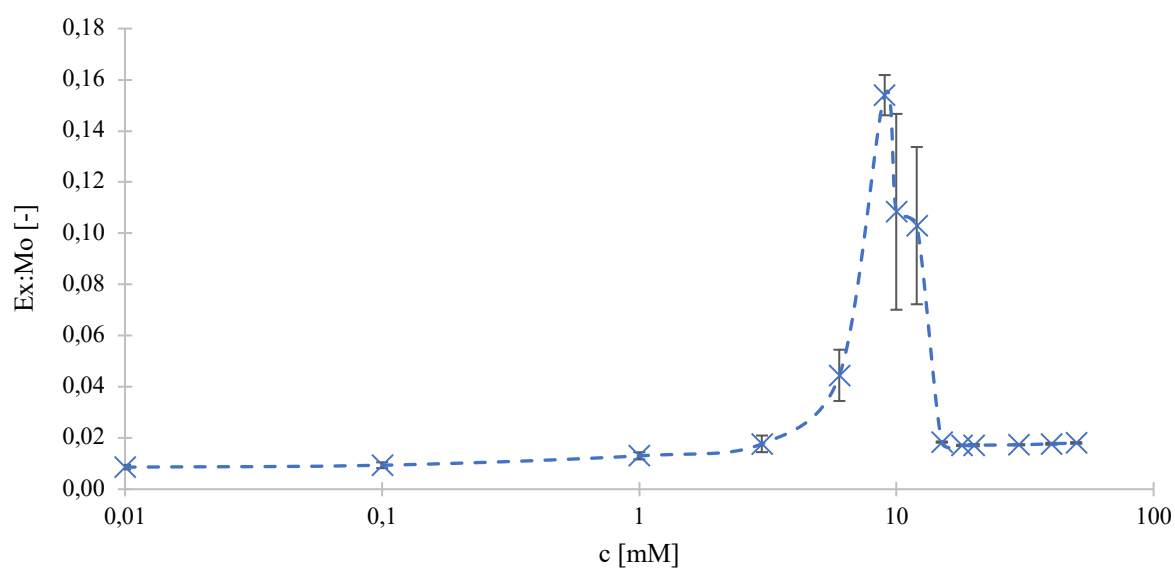
<i>Symbol</i>	<i>Název veličiny</i>
A_1	horní limita Boltzmannova modelu
A_2	spodní limita Boltzmannova modelu
x	celková koncentrace tenzidu
Δx	sklon Boltzmannova modelu
x_0	inflex Boltzmannova modelu
S_0	základní energetická hladina
S_1	singletový stav
T_1	tripletový stav
c	koncentrace
λ	vlnová délka
cm^{-1}	reciproký centimetr
Da	Dalton
g	gram
$\mu\text{g/ml}$	mikrogram na mililitr
mg/ml	miligram na mililitr
g/l	gram na litr
g/mol	gram na mol
hm. %	hmotnostní procenta
ml	mililitr
ml/kg	mililitr na kilogram
mM	milimolární
M	molární
nm	nanometr
μm	mikrometr
ot/min	otáčky za minutu
ppm	částic na jeden milion
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia

9 PŘÍLOHY

9.1 Stanovení CMC ve vodě

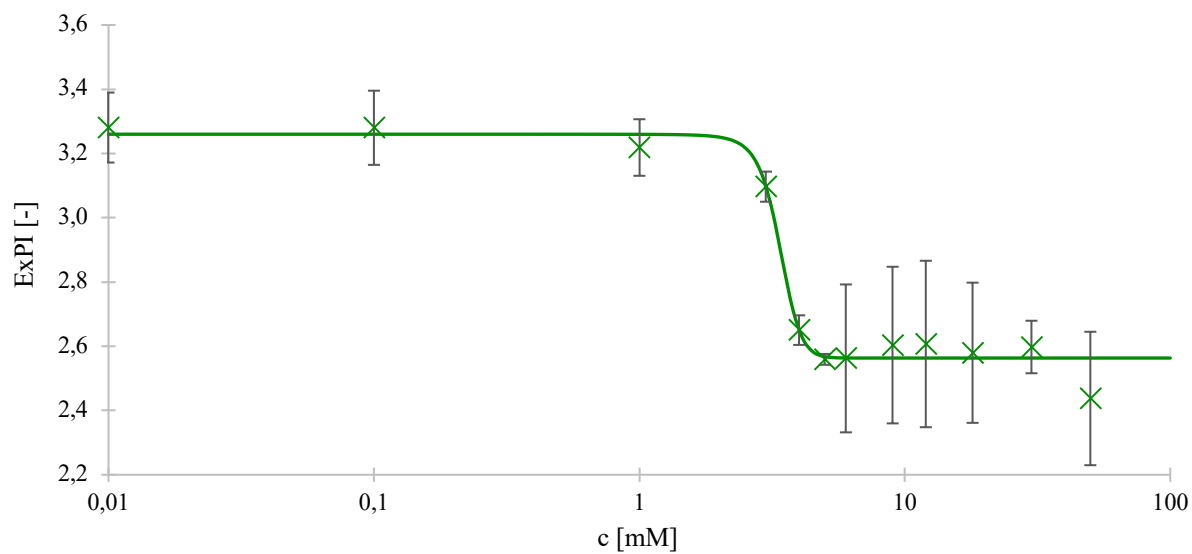


Obr. 27: Závislost $ExPI$ na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof® 4 proložená Boltzmannovým modelem

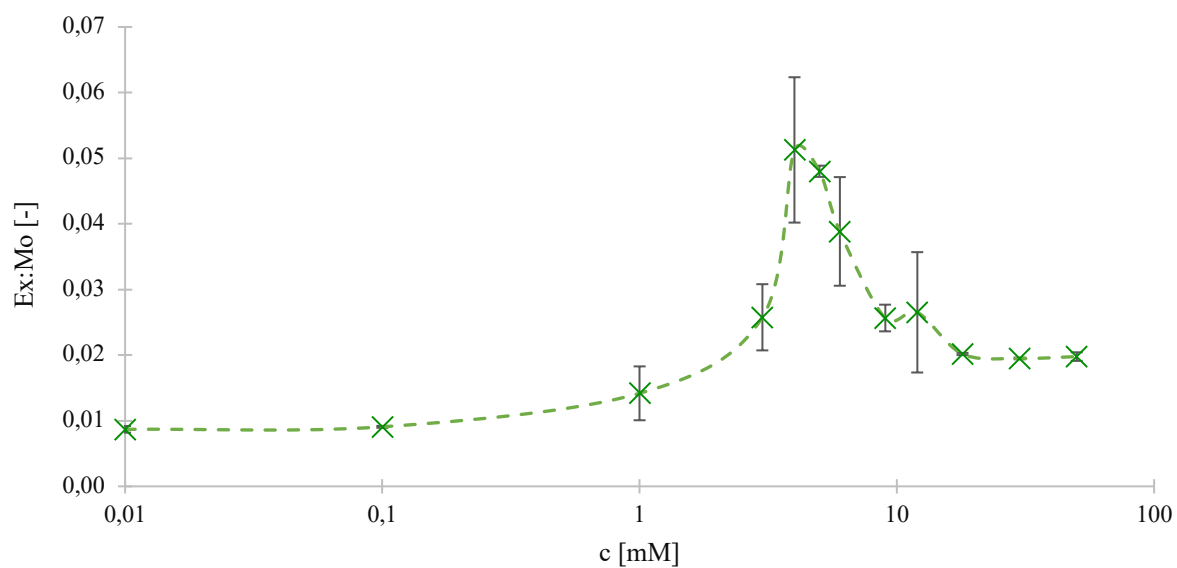


Obr. 28: Závislost $Ex:Mo$ na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof® 4

9.2 Stanovení CMC v 0,15 M NaCl

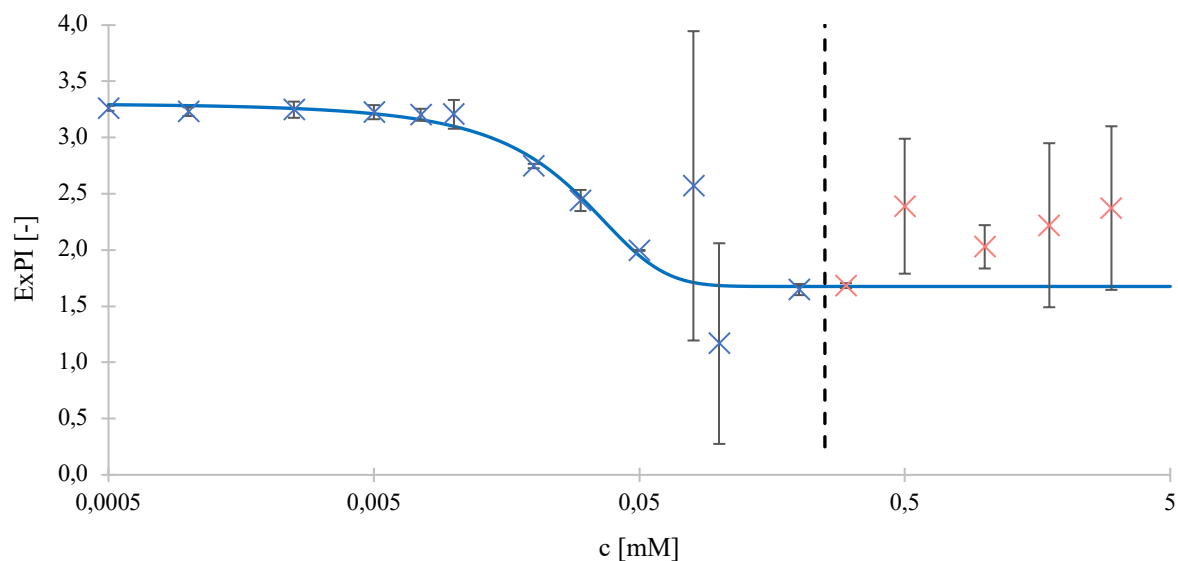


Obr. 29: Závislost ExPI na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof[®] 4 proložená Boltzmannovým modelem

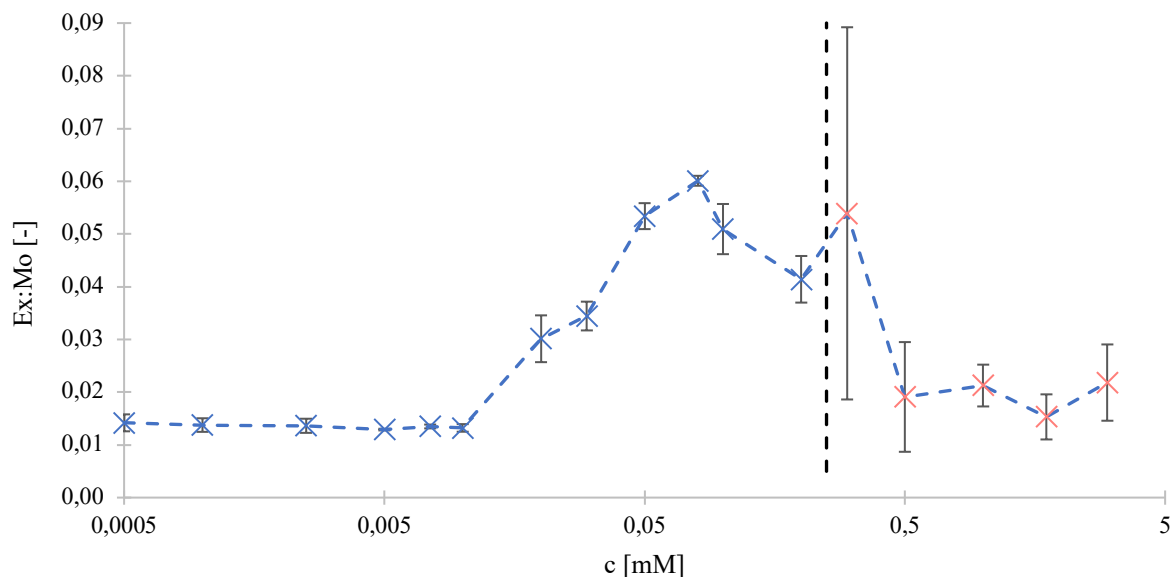


Obr. 30: Závislost Ex:Mo na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof[®] 4

9.3 Stanovení CAC ve vodě

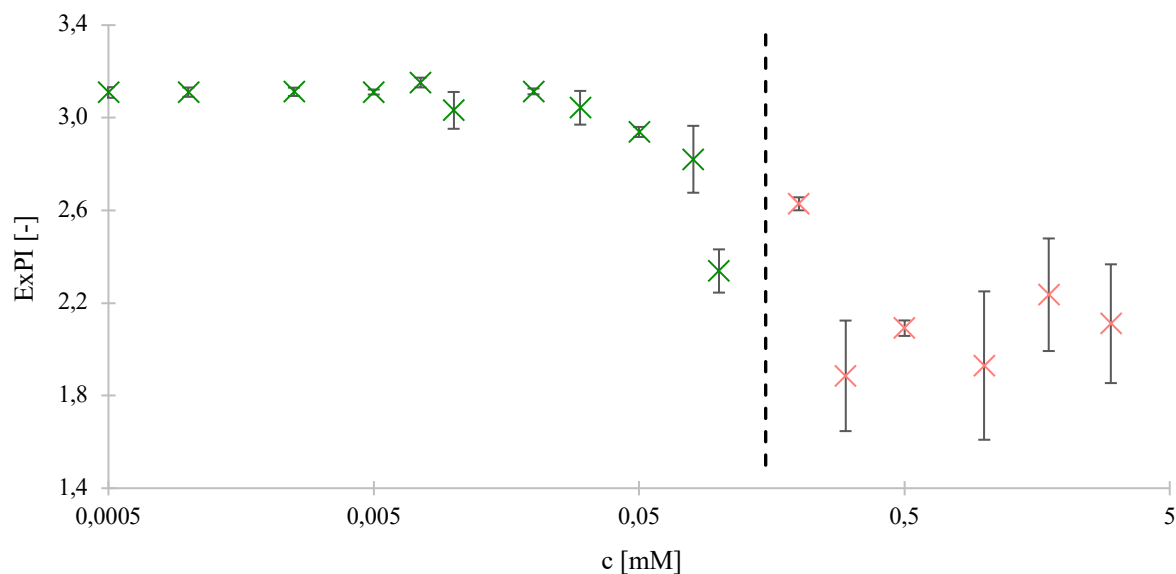


Obr. 31: Závislost ExPI na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof® 4 v prostředí 0,05 hm. % TMC proložená Boltzmannovým modelem. Předěl svislou černou čárkovanou čarou značí začátek fázové separace, která je způsobena nestabilitou systému. Růžovou barvou jsou označeny hodnoty koncentrací, které jsou již pro měření a další interpretaci nevyhovující, protože při nich dochází k fázové separaci systému.

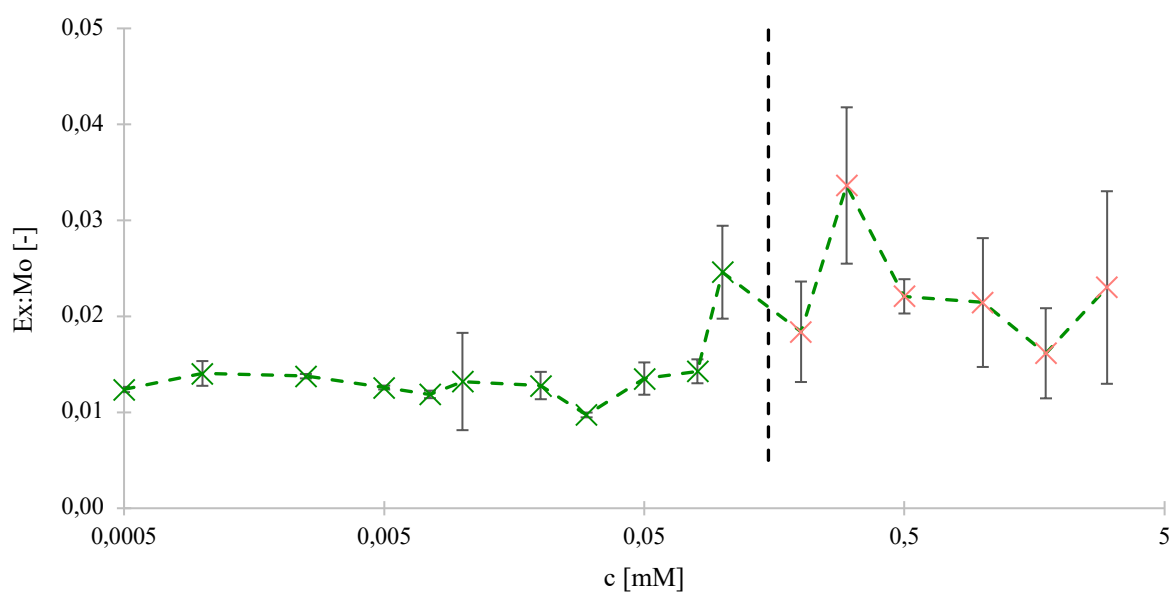


Obr. 32: Závislost Ex:Mo na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof® 4 v prostředí 0,05 hm. % TMC. Předěl svislou černou čárkovanou čarou značí začátek fázové separace, která je způsobena nestabilitou systému. Růžovou barvou jsou označeny hodnoty koncentrací, které jsou již pro měření a další interpretaci nevyhovující, protože při nich dochází k fázové separaci systému.

9.4 Stanovení CAC v 0,15 M NaCl



Obr. 33: Závislost ExPI na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof® 4 v prostředí 0,05 hm. % TMC. Předěl svislou černou čárkovanou čarou značí začátek fázové separace, která je způsobena nestabilitou systému. Růžovou barvou jsou označeny hodnoty koncentrací, které jsou již pro měření a další interpretaci nevyhovující, protože při nich dochází k fázové separaci systému.



Obr. 34: Závislost Ex:Mo na zvyšující se koncentraci tenzidu Niaproof® 4 v prostředí 0,05 hm. % TMC. Předěl svislou černou čárkovanou čarou značí začátek fázové separace, která je způsobena nestabilitou systému. Růžovou barvou jsou označeny hodnoty koncentrací, které jsou již pro měření a další interpretaci nevyhovující, protože při nich dochází k fázové separaci systému.